



OOSİT YAŞLANMASININ GENETİK MEKANİZMASI

Bahar KARTAL

DOKTORA TEZİ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

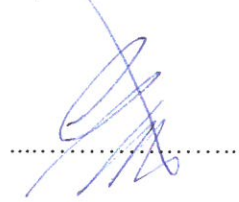
OCAK 2016

Bahar KARTAL tarafından hazırlanan“OOSİT YAŞLANMASININ GENETİK MEKANİZMASI” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Gülnur TAKE KAPLANOĞLU

Histoloji ve Embriyoloji, Gazi Üniversitesi

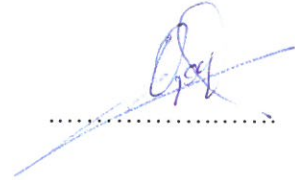
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum



Başkan : Prof. Dr. Candan ÖZOĞUL

Histoloji ve Embriyoloji, Gazi Üniversitesi

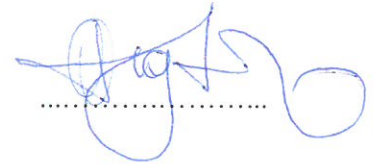
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum



Üye : Prof. Dr. Çiğdem ELMAS

Histoloji ve Embriyoloji, Gazi Üniversitesi

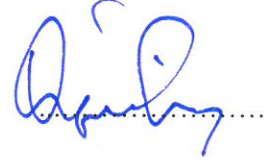
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum



Üye : Doç. Dr. Özgür ÇINAR

Histoloji ve Embriyoloji, Ankara Üniversitesi


Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum



Üye : Doç. Dr. Ayten TÜRKKANI

Histoloji ve Embriyoloji, TOBB Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum



Tez Savunma Tarihi: 18/01/2016

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Doktora Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

.....
Doç. Dr. Ufuk KOCA ÇALIŞKAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Bahar KARTAL

OOSİT YAŞLANMASININ GENETİK MEKANİZMASI
(Doktora Tezi)

Bahar KARTAL

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Ocak 2016

ÖZET

Oositler enerji ihtiyaçlarını, mitokondriyonlarda gerçekleşen oksidatif fosforilasyonla sağlarlar. Mitokondriyal DNA'nın (mtDNA), mitokondriyon iç zarının iç kısmında, reaktif oksijen türleri (ROS)'ların üretildiği yerde bulunması nedeniyle, oksidatif hasara uğrar. Mitokondriyonlarda üretilen ROS nükleer DNA (nDNA)'daki hasarı indükleyerek yaşlanmaya katkıda bulunur. Oluşan DNA hasarında okside bazların tamirinde, mitokondriyal ve nükleer DNA'nın kullandığı başlıca tamir mekanizması baz ekzisyon tamiri (BER)'dir. mtDNA'nın DNA tek zincir kırık tamir mekanizması kullandığına dair veriler vardır. Bu bilgiler ışığında çalışmamızda yaşın oosit mitokondriyonu üzerine etkisinin çeşitli moleküler genetik ve immunofloresan yöntemlerle belirlenmesi amaçlandı. Çalışmada, genç (n=5) ,(3-4 ay) ve yaşlı (n=5), (9-12 ay) FVB dişi farelere ovulasyon indüksiyonu yapılarak artan sayıda oositler toplandı. Her bir oositte, mtDNA tamir yollarında yer alan mitokondriyal transkripsiyon faktör A (TFAM) , Nei-like DNA glikozilaz1(NEIL1), tirozil DNA fosfodiesteraz 1 (TDP1) ve poly ADP riboz 1 (PARP1) genlerinin ifadelenmeleri kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) yöntemi ile analiz edildi. Gen ekspresyon analizlerini doğrulamak amacıyla ise genç ve yaşlı fare oositlerinde PARP1 ve TDP1 protein ekspresyonları immünofloresan yöntemi kullanılarak belirlendi. mtDNA paketleme protein olan ve oksidatif hasarlı mtDNA'ya hasarsız mtDNA'ya oranla daha fazla bağlanan TFAM gen ekspresyonunun, yaşlı fare oositlerinde genç fare oositlerine oranla anlamlı derecede arttığı saptandı. BER'de yer alan ve hasarlı bazlar üzerine etkili çift fonksiyonlu bir DNA glikozilaz olan NEIL1 gen ekspresyonu, yaşlı fare oositlerinde genç farelere oranla azalmış olarak saptandı. DNA tek zincir kırıklarında sensör görevi gören bir protein olan PARP1 ve DNA tamir enzimi olan ve DNA tek zincir kırık tamirinde görev alan TDP1 gen ekspresyonları değerlendirildiğinde ise her iki gene ait ekspresyonların yaşlı fare oositlerinde genç farelere kıyasla, anlamlı derecede yüksek olduğu gözlemlendi. İmmünofloresan boyamalarda da yaşlı fare oositlerinde genç farelere kıyasla PARP1 ve TDP1 protein ifadelenmesinde paralel artış belirlendi. Sonuç olarak yaşlı oositlerde TFAM'in yüksek ve NEIL1'in düşük ifadelenmesi, yaşla birlikte oksidatif DNA hasarının birikmesinden dolayı DNA tamirindeki azalmanın göstergesi olarak kabul edilirken, PARP1 ve TDP1 gen ve protein ekspresyonlarındaki yaşa bağlı paralel artış, oositlerde yaşla birlikte DNA tek zincir hasarının arttığı ve bu kırıklara dengeleyici bir tamir yanıtının olduğu kanısını doğruladı.

Bilim Kodu : 1033
Anahtar Kelimeler : Oosit, Yaşlanma, Mitokondriyal DNA
Sayfa Adedi : 76
Danışman : Prof. Dr. Gülnur TAKE KAPLANOĞLU

GENETIC MECHANISMS OF OOCYTE AGING

(Ph. D. Thesis)

Bahar KARTAL

GAZI UNIVERSITY

INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES

January 2016

ABSTRACT

Oocytes rely on energy produced by mitochondria via oxidative phosphorylation. Mitochondrial DNA (mtDNA) locates on the inner side of the mitochondrial inner membrane, where most reactive oxygen species (ROS) are generated, rendering it susceptible to oxidative damage. Mitochondria contributes to the aging process, ROS produced in the mitochondria induce damage on mtDNA. Base excision repair (BER) is one of the main pathways for the repair of oxidized modifications both in nuclear and mtDNA. There is some evidence that mtDNA use single strand break repair. The aim of the study is to determine the effect of aging on mitochondria of the oocytes by using several molecular genetic and immunofluorescence techniques. We performed ovulation induction to young (n=5), (3 to 4 months) and old (n=5), (9 to 12 months) FVB female mice and collected the oocytes. We analyzed the expression of mitochondrial transcription factor A (TFAM), Nei-like DNA glycosylases (NEIL1), tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 (TDP1) and poly ADP-Ribose polymerase (PARP1) genes that are involved in mtDNA repair pathways, by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR in individual oocytes). To confirm the findings of gene expression studies we also analyzed the protein expression of PARP1 and TDP1, in young and old mouse oocytes by using immunofluorescence staining. We found that the expression of TFAM, a packaging protein that binds to oxidatively-damaged mtDNA with greater avidity than to undamaged mtDNA, was significantly increased in old oocytes compared to young ones. NEIL1 is involved in BER and codes for bifunctional glycosylases that act on damaged bases. We found that the expression of NEIL1 was reduced in older oocytes. PARP1 is a nuclear protein that serves as a sensor of ssDNA breaks and TDP1 is a DNA repair enzyme, which participates in the repair of mtDNA. We found that the expressions of TDP1 and PARP1 were significantly higher in old oocytes compared to young ones. We observed a parallel increase in the protein expression of PARP1 and TDP1, in old mouse oocytes by using immunofluorescence staining. In conclusion, the higher expression of TFAM and lower expression of NEIL1 in older oocytes, suggests that there may be an age-related decline in DNA repair in aging oocytes resulting in accumulating ROS. The parallel increase of gene and protein expression of PARP1 and TDP1 with the age, suggest that single-strand damage is also increased in oocytes with age and there may be a compensatory response to repair these breaks.

Science Code : 1033
Key Words : Oocyte, Aging, Mitochondrial DNA
Page Number : 76
Advisor : Prof. Dr. Gülnur TAKE KAPLANOĞLU

TEŞEKKÜR

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Candan ÖZOĞUL'a akademik hayatıma katkılarından dolayı çok teşekkür ederim. Doktora öğrenimim süresince hoşgörüsü ve desteği ile yanımda olan danışmanım Sayın Prof. Dr. Gülnur TAKE KAPLANOĞLU' na çok teşekkür ederim. Doktora tez çalışmam süresince verdiği destekten dolayı Sayın Prof. Dr. Kutluk OKTAY'a çok teşekkür ederim. Anabilim dalımızda görev yapan saygı değer hocalarım Sayın Prof. Dr. Suna ÖMEROĞLU ve Sayın Prof. Dr. Çiğdem ELMAS'a çok teşekkürler.

New York Medical College Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Moleküler Üreme ve Fertilite Koruma Laboratuvarında doktora tezimi gerçekleştirmeme olanak sağlayan TÜBİTAK'a teşekkürler.

New York Medical College Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Moleküler Üreme ve Fertilite Koruma Laboratuvarı'nda her konuda destek olan sevgili çalışma arkadaşlarım Dr. Shiny TITUS, Dr. Volkan EMİRDAR, Biran MUSUL, Dr. Yodo SUGISHITA, Dr. Young CHUNG, Dr. HeeShuk CHAE, Robert STOBZKI ve Gabriela GOLDBERG'e teşekkür ederim.

Doktora tezimin her aşamasında yanımda ve yardımcı olan, Amerika'da geçirdiğim süreçte varlığını her an hissettiğim canım kardeşim Arş. Gör. Sanem SARIBAŞ' a sonsuz teşekkürler.

Her zaman yanımda olan, kararlarımı destekleyen ve beni cesaretlendiren hayatı paylaştığım eşim Burak KARTAL'a teşekkür ederim. Amerika'da geçirdiğimiz süreçte desteğini her zaman hissettiğim aileme çok teşekkür ederim. Hayatım boyunca her zaman arkamda ve yanımda olan, Türkiye'den Amerika'ya uzanan doktora tez projemin gerçekleşmesini sağlayan canım annem Lale KÜÇÜKOĞLU'na ve canım kızım Elif Nil KARTAL'a sonsuz teşekkürler.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	ix
RESİMLERİN LİSTESİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİ	5
2.1. Oosit Gelişimi (Oogenezis)	5
2.2. Oosit Olgunlaşması	8
2.3. Mitokondriyon	10
2.3.1. Mitokondriyonlarda oksidatif fosforilasyon	11
2.3.2. Mitokondriyonlarda ROS üretimi	12
2.3.3. Mitokondriyon ve yaşlanma	13
2.3.4. Mitokondriyal DNA yapısı	14
2.4. Oosit ve Mitokondriyon	29
2.4.1. Oosit ve erken embriyolarda mitokondriyonların yapısı	29
2.4.2. Gelişim evrelerine göre mitokondriyonların yeri ve dağılımı	29
2.4.3. Mitokondriyonların oositteki görevleri	30
2.4.4. Oosit yaşlanması ve mitokondriyon ilişkisi	31
3. GEREÇ ve YÖNTEM	33
3.1. Farelerde Ovulasyon İndüksiyonu ve Oositlerin Toplanması	33
3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ve Gerçek Zamanlı PCR Hakkında Genel Bilgi	33

	Sayfa
3.2.1. Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu	34
3.2.2. Tek hücre kantitatif gerçek-zamanlı PCR.....	35
3.3. İmmünofloresan Tekniği	44
3.4. İstatistiksel Analiz	45
4. BULGULAR	47
4.1. Kantitatif Gerçek zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR)	47
4.2. İmmünofloresan Boyama.....	48
5. TARTIŞMA.....	51
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	59
KAYNAKLAR.....	61
EKLER.....	77
EK-1. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Kararı	78
EK-2. Deney Hayvanları Uygulama ve Etik Kursu Katılım Sertifikası.....	79
ÖZGEÇMİŞ	80

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Mayoz bölünmenin farklı evrelerinde köpek oositinin florsans mikroskop görüntüsü	10
Şekil 2.2. Oksidatif Fosforilasyon	12
Şekil 2.3. Mitokondriyon ROS üretimi	13
Şekil 2.4. ROS tarafından indüklenen mtDNA hasarı	14
Şekil 2.5. İnsan mitokondriyon genomunun şekli.....	16
Şekil 2.6. TFAM mtDNA Elektron mikroskop görüntüsü	15
Şekil 2.7. Mitokondriyon BER	21
Şekil 2.8. mtDNA tek zincir kırık tamiri.....	26
Şekil 3.1. qRT-PCR yöntem tablosu	36
Şekil 3.2. RT-PCR verilerinin karşılaştırmalı CT yöntemiyle analizi.....	44
Şekil 4.1. Oositlerde yaşın DNA hasar ve tamir genlerinin ifadenmesi üzerine etkisi (*: yaşlı ve genç gruplar arasındaki fark anlamlı)	47

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 4.1. Genç ve yaşlı fare oositleri anti-PARP-1 (FITC, yeşil) ve anti-TDP1 (FITC, yeşil) primer antikorlarla işaretlenmesi ve konfokal mikroskoptaki görüntüsü (X40), Differential interference contrast (DIC), Kırmızı: Çekirdek, Yeşil: Fluorescein isothiocyanate (FITC).....	50



dsDNA	Çift zincir DNA
EGF	Epidermal büyüme faktörü
ETS	Elektron taşıma sistemi
EXO1	Ekzonükleaz1
EXOg	Endonükleaz G-benzeri
FADH	Flavin adenin dinükleotid
FEN1	Flap endonükleaz 1
FSH	Folikül uyarıcı hormon
GnRH	Gonadotropin serbestleştirici hormon
GV	Germinal vezikül
GVBD	Germinal Vezikül Yıkımı
HR	Homolog Rekombinasyon
IGF-1	İnsülin benzeri büyüme faktörü 1
IU	İnternational units
LH	Lüteinleştirici hormon
LIG3	Ligaz 3
LP-BER	Uzun yamalı baz ekzisyon tamiri
MI	Metafaz I
MII	Metafaz II
mm	Milimetre
MPF	Sitoplazmik maturasyon promotör faktörün
mtDNA	Mitokondriyal DNA
mTERF	Mitokondriyal transkripsiyon sonlandırıcı faktör
MTOC	Mikrotübülüs düzenleyici merkez
MYH	<i>Escherichia coli</i> MutY homologu
NADH	Nikotinamid adenin dinükleotit
ND	Nikotinamid adenin nükleotit dehidrogenaz alt ünitesi
nDNA	Nüklear DNA
NEIL1	Nei-like DNA glikozilaz1
NEIL2	Nei-like DNA glikozilaz2
NHEJ	Homolog olmayan rekombinasyon
nm	Nanometre
OGG1	8-oxoguanine DNA glikozilaz-1

OH Hidroksil

Kısaltmalar Açıklamalar

P	Fosfat
PARP1	Poly ADP riboz 1
PBS	Fosfat tampon solüsyon
PI	Profazl
PNKP	Poinükleotid kinaz fosfotaz
Pol γ	Polimeraz gamma
qRT-PCR	Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RECQL4	RecQ helikaz-benzeri 4
ROS	Reaktif oksijen türleri
RPA	Replikasyon proteini A
rRNA	Ribozomal ribonükleik asit
RT-PCR	Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SP-BER	Kısa yamalı baz ekzisyon tamiri
SSBR	Tek zincir kırık tamiri
SSBs	Tek zincir kırıkları
ssDNA	Tek zincir DNA
TDP1	Tirozil fosfodiesteraz 1
TEM	Geçirimli elektron mikroskop
TERF	Transkripsiyon sonlandırıcı faktör
TFAM	Transkripsiyon faktör A
TI	Telofaz 1
tRNA	Taşıyıcı ribonükleik asit
UNG1	Urasil-DNA glikozilaz 1
μg	Mikrogram
μl	Mikrolitre
μm	Mikrometre
XRCC4	X-ray tamir çapraz-tamamlama protein 4
ZP	Zona pellusida



1. GİRİŞ

İnsan dişi üreme sistemi diğer vücut sistemleriyle karşılaştırıldığında çok daha hızlı yaşlanır. Ovaryum yaşlanması, folikül sayısının kademeli olarak azalması ve eş zamanlı olarak da oosit sayısında ve kalitesindeki düşüş olarak tanımlanır [1].

Oositler fetal gelişim sürecinde oluşur. Fetal gelişimin 4. ayında, ovariumlarda 6-7 milyon oosit tek katlı yassı granuloza hücreleriyle çevrelenerek primordiyal folikül havuzu oluşur [2-4]. Bu havuz gelişen folikül kaynağı olarak hizmet eder. Primordiyal foliküller çok uzun yıllar (40 yıla kadar) dinleme halinde kalabilir [5-7]. Pubertenin başlamasıyla, her ay, primordiyal folikül havuzundaki bir miktar folikül aktive edilir ve sırasıyla primer, preantral ve antral foliküle farketilir. Sonunda sadece bir folikül (dominant folikül) pre-ovulatuvar evreye erişir, diğerleri ise gelişimin farklı evrelerinde atreziye uğrar [5-8].

Eş zamanlı olarak oosit sayısı da azalır. Doğumda ovariumda yaklaşık 1-2 milyon folikül bulunurken [9] pubertenin başlamasıyla sayıları 300 000-500 000'e düşer [10]. Üreme hayatı boyunca ise primordiyal folikül sayısı her ay sabit bir oranla yaklaşık 1 000 folikül olmak üzere azalır [11,12]. Ancak primordiyal foliküllerin %99,9'dan fazlası gelişimin farklı evrelerinde atreziye uğrar ve sadece yaklaşık 400-500 folikül insan yaşam süresinde ovulasyon ile atılır [11].

Daha önce yapılan çalışmalarda kadınlarda 30 yaşından sonra fekonditenin dereceli olarak azaldığı saptanmıştır [13,14]. Üreme yaşlanmasının ilk belirtisi menstruel siklus uzunluğunun 2-3 gün kısalmasıdır [15]. Menstruel siklus düzensizleştiğinde ilk akla gelen folikül sayısının azalmaya doğru gittiğidir. Mevcut foliküllerin yetersizliği, menstruel kanama aralıklarının uzamasına veya kanamanın olmamasına yol açar. Ovaryum yaşlanmasının bu aşaması menopoza geçiş olarak tanımlanır [16]. Menopoza geçişin başlangıç periyodu, 34-54 yaş aralığında, ortalama 46 yaşında gerçekleşir [17,18]. Son menstruel periyod, ovariumlarda yaklaşık 1 000 folikül kaldığında, 40-60 yaşlar arasında ortalama 51 yaşında gerçekleşir [12].

Ovaryum yaşlanmasıyla birlikte oosit kalitesi de düşer, düşüklerde ve kromozomal anomalilerde artma gözlenir ve bu olaylar genellikle 35 yaşından sonra olur [10,19-21]. İleri kadın yaşlarında oosit kalitesindeki azalmanın nedeninin mayotik ayrılmama olduğu ve bu durumun embriyoda anöploidi ile sonuçlandığına inanılır [22,23].

Genel olarak yaşla birlikte, oosit kalitesine ve sayısına etki eden faktörler net olarak tanımlanamamıştır. Fakat birçok faktör ovaryum yaşlanmasını etkilemektedir, bunlar arasında genetik faktörler, mikroçevresel faktörler ve patolojik faktörler sayılabilir [24].

Oosit sitoplazması içinde çok sayıda bulunan mitokondriyonun, oositin fonksiyonel bütünlüğü, hücresel devamlılığı ve gelişim süreci için önemlidir. Memeli oositinde yaklaşık olarak 100 000-200 000 mitokondriyon DNA (mtDNA) vardır. Postimplantasyon evresine kadar mtDNA replikasyonu olmadığından oositler her türlü mitokondriyal bozukluğa karşı hassastır. Ooplazmada bulunan mitokondriyonların esas görevi fertilizasyon ve implantasyon öncesi embriyo gelişimi için ATP üretmektir [25].

Oksidatif fosforilasyonda yer alan 92 gen tanımlanmıştır. Bunlardan 13 tanesi mtDNA'sında, 79 tanesi nüklear DNA (nDNA)' da kodlanır [26]. mtDNA, nDNA' ya oranla daha fazla hasara duyarlı kalır ancak mtDNA da tamir mekanizmaları vardır. mtDNA tamir mekanizmasının başlıcası, baz ekzisyon tamiri (BER) dir [27,28]. BER; reaksiyon kaskadları temeline dayanır, öncelikle hasarlı bazı tespit eder ve tanır, bu basamakları enzimatik işlem süreci izler, bu durum lezyonu uzaklaştırmaya ve genomik bütünlüğü yeniden oluşturmaya yardımcı olur [29].

Nüklear solunum faktör 1 (NRF1) ve TFAM, çeşitli dokularda mtDNA replikasyonu ve transkripsiyonunu düzenlerler [30]. TFAM, insan mtDNA'sının D-lobunda, ağır ve hafif zincir promotor kısımlarına sekans bağlanmasında önemli rol oynar. Bu promotor, mtDNA transkripsiyonu ve replikasyonu düzenleniminin kontrol alanı olarak davranır [31].

Yapılan alışmalar kalıtsal mitokondriyon bozukluklarının erken insan gelişimi sırasında mikrotübül organizasyonunu, kromozomların ayrılmasını, hücre siklusu sürecini, kompaksiyon, kavitasyon ve blastosist evrelerini olumsuz yönde etkilediğini göstermiştir. Mitokondriyon ile ilişkili değişiklikler oosit kalite ve gelişim yeterliliğinin belirtecidir [32,33].

Başta mitokondriyal elektron transportu olmak üzere çeşitli sentez ve degradasyon reaksiyonlarında reaktif oksijen ürünleri (ROS) oluşmakta ve prooksidan/antioksidan dengenin prooksidanlar lehine kayması sonucunda gelişen oksidatif stres, çeşitli mekanizmalar ile biyomoleküllere hasar vermektedir. ROS oluşumundaki artış, antioksidan enzim düzeylerindeki azalma ve/veya DNA onarım mekanizmalarında defekt olması oksidatif DNA hasarının artmasına neden olmaktadır. Oksidatif hasara bağlı olarak DNA'da, tek ve çift zincir kırıkları, abazik alanlar, baz modifikasyonları (baz katılımı, bazlarda yeniden düzenlenme), şeker hasarı meydana gelebilir veya DNA ile protein arasında çapraz bağlanma olabilir [34,35]. mtDNA'da oksidatif hasar ve bu hasara bağlı mutasyonların yaşlanma sürecinde önemli olduğu ve mitokondriyonların yaşlanmada anahtar rol oynadıkları Miquel ve ark. tarafından 1980'de açıklanmıştır [36].

Yapılan ön çalışmalarda, DNA onarım mekanizmalarında yaşa bağlı değişimler olduğu belirlenmiştir [37]. Bu değişimlerin mtDNA'da da aktif olarak gözlenebileceği hipotezinden yola çıkarak çalışmamızda, oositlerde yaşlanmayla bağlantılı mtDNA tamir mekanizmalarındaki değişikliklerin moleküler genetik teknikler ve immünofloresan yöntemleri ile incelenmesi amaçlanmıştır. Çalışmamızın sonunda belirlenecek önemli oosit yaşlanma genlerinin ileride terapötik hedef haline gelebileceği ve sonuçta oosit yaşlanmasını geciktirecek tedavileri geliştirilebileceği kanısındayız.

2. GENEL BİLGİ

2.1. Oosit Gelişimi (Oogenezis)

Olgun kadın ve erkek üreme hücreleri, intrauterin gelişimin 3. haftasında vitellus kesesi duvarında beliren ilkel üreme hücrelerinden gelişirler. Bu hücreler vitellus kesesinden, gelişmekte olan gonadlara ameboid hareketlerle göç eder ve 4. haftanın sonu veya 5. haftanın başında gonadlara ulaşırlar.

Primordiyal germ hücreleri dişi gonada ulaştınca oogonyumlara farklılık gösterir. Oogonyumlar ard arda mitozla çoğalarak 3. ayın sonunda kümeler oluştururlar ve bir sıra yassı epitel hücreleriyle çevrelenirler. Bu küme içindeki oogonyumların tümü olasılıkla tek bir ilkel germ hücresinden gelişir. Oogonyumları çevreleyen yassı epitel hücreleri ovaryumları çevreleyen yüzey epitelinden köken alır ve folikül hücreleri olarak adlandırılır.

Oogonyumların çoğu mitozla bölünmeyi sürdürürken, bir kısmı da büyüyerek primer oositlere farklılık gösterir. Oluşan primer oositler hemen DNA'larını bir kat arttırarak, birinci mayoz bölünmenin profaz evresine girerler. Birkaç ay içinde oogonyumların sayısı hızla artar ve gelişimin 5. ayında, yaklaşık 7 000 000'a ulaşır. Bu dönemden sonra başlayan hücre dejenerasyonu, oogonyumların ve primer oositlerin büyük çoğunluğu atretik hale gelir. 7. ayda yüzeye yakın yerleşmiş birkaç oogonyum dışında çoğunluğu dejenere olur. Hayatta kalan primer oositlerin tamamı, birinci mayoz bölünmeye girmiş ve her biri ayrı ayrı tek katlı yassı epitel hücreler ile çevrelenmiştir. Primer oosit, çevresindeki tek katlı yassı epitel hücreleriyle birlikte primordiyal folikül olarak adlandırılır [38-40].

Doğumda, tüm primer oositler I.mayoz bölünmenin profaz evresindedir. Ancak, bölünmenin metafaz ile devam etmesi gerekirken, primer oositler çekirdek kromatinin seyrek ve düzensiz bir yapılaşma gösterdiği birinci mayoz bölünmenin profaz evresinin diploten evresine girerler ve puberteye kadar dinlenme halinde kalırlar. Bu süre boyunca, oositin olgunlaşması, folikül hücreleri tarafından salgılanan oosit maturasyon inhibitörü tarafından baskılanır.

Doğumda ovaryumlardaki primer oositlerin sayısının, yaklaşık 700 000 ile 2 000 000 arasında değişir. Puberteye kadar bunların büyük bölümü dejenere olarak atretik hale gelir ve puberte başlangıcında bu sayı 400 000'e düşer. Ancak, bir kadının üreme periyodu içinde 400-500 kadarı ovulasyonla atılır.

Foliküllerin büyümesi hipofizden salınan folikül uyarıcı hormon (FSH) ile, büyüme faktörleri olan; epidermal büyüme faktörü (EGF), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF-1) ile kalsiyum iyonlarının etkisine bağlıdır

Pubertenin başlamasıyla, her ovaryum siklusunda 5 ile 15 arasında değişen sayıda primordiyal folikül olgunlaşmaya başlar. Primordiyal folikül en çok bulunan ve en küçük (25 µm çapında) olan yassı foliküler hücreleri tarafından çevrelenmiş foliküldür. Primordiyal foliküller, fetal ovaryumlarda geliştikten sonra bir dinlenme evresine girer ve bu evrede bekler. Bekleme evresinden çıkan foliküllere primer foliküller denir ve bunlar iki tiptir. Tek tabakalı primer foliküller, etrafında tek sıralı kübik foliküler hücreler bulunur. Çok tabakalı primer foliküller, çok katlı ve çoğalan kübik hücrelerle çevrilidir. Çoğalan bu hücrelere granüloza hücreleri, oluşturdukları katmana ise granüloza hücre katmanı denir [38,41, 42].

Granüloza hücreleri bir bazal lamina üzerine otururlar. Primer oosit evresinde, primer oosit zona pellusida (ZP) ZP1, ZP2, ZP3 denilen 3 farklı glikoprotein yapısında bir madde salgılayarak, primer oosit hücre zarıyla granüloza tabakası arasında oositi çevreleyen zona pelusida denilen bir tabaka oluşturur. Granüloza hücrelerinin ince sitoplazmik uzantıları zona pellusidayı deler ve oositin mikrovilluslarıyla temas eder. Temas noktasında oluklu bağlantılar geçiş bağlantıları bulunur [39, 41, 42]. Sonraki evrede, folikülü çevreleyen stromal hücreler, teka denilen hücresel bir katman oluşturacak şekilde düzenlenir. Teka katmanı daha teka interna ve teka eksterna olmak üzere iki tabakaya ayrılır. Gelişmekte olan folikülün bazal laminasına komşu, iyi damarlanmış teka interna tabakası, bir androjen prekürsörü olan androstenediyonu salgılar. Androstenediyon, testosteron üretimi için folikül hücrelerine taşınır. Daha sonra testosteron aromataz tarafından östradiyole çevrilir. Foliküler hücreler, östrojenin doğrudan üretimi için gerekli olan enzimlere sahip değildir. Bu nedenle foliküler hücreler folikülogenez sırasında steroid prekürsörlerini üretemezler. Teka

eksterna, bağ dokusundan bir tabakadır ve ovaryumun stroması ile devam eder[41].

Folikül büyüdükçe granüloza hücreleri arasındaki içi sıvı dolu boşluklar birikmeye başlar. Bu boşluklar birleşerek daha büyük boşlukları (antrum) oluşturur. Foliküler antrumu dolduran sıvı kan damarlarından plazmanın sızmasıyla oluşup yerel salgılar ile metabolizma ürünleri ile modifiye hale gelir . Antrum sıvısı (likör foliküli), hiyaluronat, steroidler, büyüme faktörleri ve gonadotropinlerden zengindir. Bu durumdaki foliküle sekonder folikül denir [43]. Başlangıçta ay şeklinde olan antrum zamanla büyür. Oositi çevreleyen granüloza hücreleri antrumun yanında bozulmadan kalarak kümülüs ooforusu oluştururlar. Ovulasyona yakın evrede folikül giderek büyür ve olgun folikül olarak adlandırılan Graaf folikülü oluşur. Graaf folikülü 15-20mm çapındadır[39,41, 44].

İnsanlarda Gonadotropin Salgılatıcı Hormon (GnRH) artışının LH ve FSH seviyesini düzenlediği ve bu sayede folikülü ovulasyona götürdüğü bilinmektedir. Pubertede GnRH salınımının başlaması hipofizden FSH ve LH salınımını stimüle eder. Hipofiz hormonlarının etkisiyle ovaryumda 28-30 gün süren ovarial döngü şekillenir. Her döngüde FSH etkisiyle folikül gelişmeye başlar, gelişen follikülden salgılanan östrojen etkisi ile LH salınımı uyarılır ve ovulasyon gerçekleşir. FSH etkisi ile 5-15 adet follikül gelişmeye başlasa da bunlardan ancak bir tanesi tam anlamıyla olgunluğa erişebilir. Diğerleri atretik hale gelir. Hangi folikülün o ay büyüme evresine gireceği ve dominant folikül olarak seçileceğini belirleyen faktörler bilinmemektedir [45].

Folikül olgunlaşması tamamlanırken primer oosit birinci mayoz bölünmesini tamamlayarak büyüklükleri farklı, ancak her biri haploid kromozomlu (n) (dDNA) 2 yavru hücre oluşturur. Bu hücrelerden biri sitoplazmanın büyük bir kısmını içeren sekonder oosit diğeri ise çok az sitoplazma içeren 1. kutup cisimidir. 1. kutup cisimi, oositin hücre zarı ile zona pellusida arasındaki perivitellin aralıkta yer alır. Birinci mayoz bölünme ovulasyondan hemen önce tamamlanır. Bundan hemen sonra sekonder oosit DNA eşleşmesi olmadan II. mayoz bölünmeye girer. Sekonder

oositte bölünme mekiği oluşur. Kromozomlar ovulasyondan 3 saat önce metafaz plağında dizildiklerinde ovulasyon gerçekleşir ve oosit ovaryumdan dışarıya atılır. II. mayoz bölünme ancak sekonder oosit , bir spermiyumla döllendiği zaman tamamlanır. Döllenme gerçekleşmez ise, ovulasyondan 24 saat sonra dejenere olur [39].

2.2. Oosit Olgunlaşması

Oosit olgunlaşması nukleus ve sitoplazmada gerçekleşen değişimleri tanımlamak üzere nükleer ve sitoplazmik olgunlaşma olarak ikiye ayrılır. Nükleer olgunlaşma oositin germinal vezikül (GV) evresinden, metafaz II (MII) aşamasına kadar geçirdiği süreç olarak tanımlanır. Nükleer olgunlaşma; germinal vezikülün yıkılması (GVBD), kromozom yoğunlaşması, Metafaz I (MI) plağının oluşumu, homolog kromozomların ayrılması, birinci kutup cisimciğinin atılması ve MII deki beklemeyi kapsar [46,47].

Sitoplazmik olgunlaşma bu sırada meydana gelen yapısal değişiklikleri içeren süreçtir. Sitoplazmik olgunlaşma, oositin normal bir fertilizasyon, bölünme ve blastosist gelişimini düzgün şekilde gerçekleştirebilmesini sağlar [46].

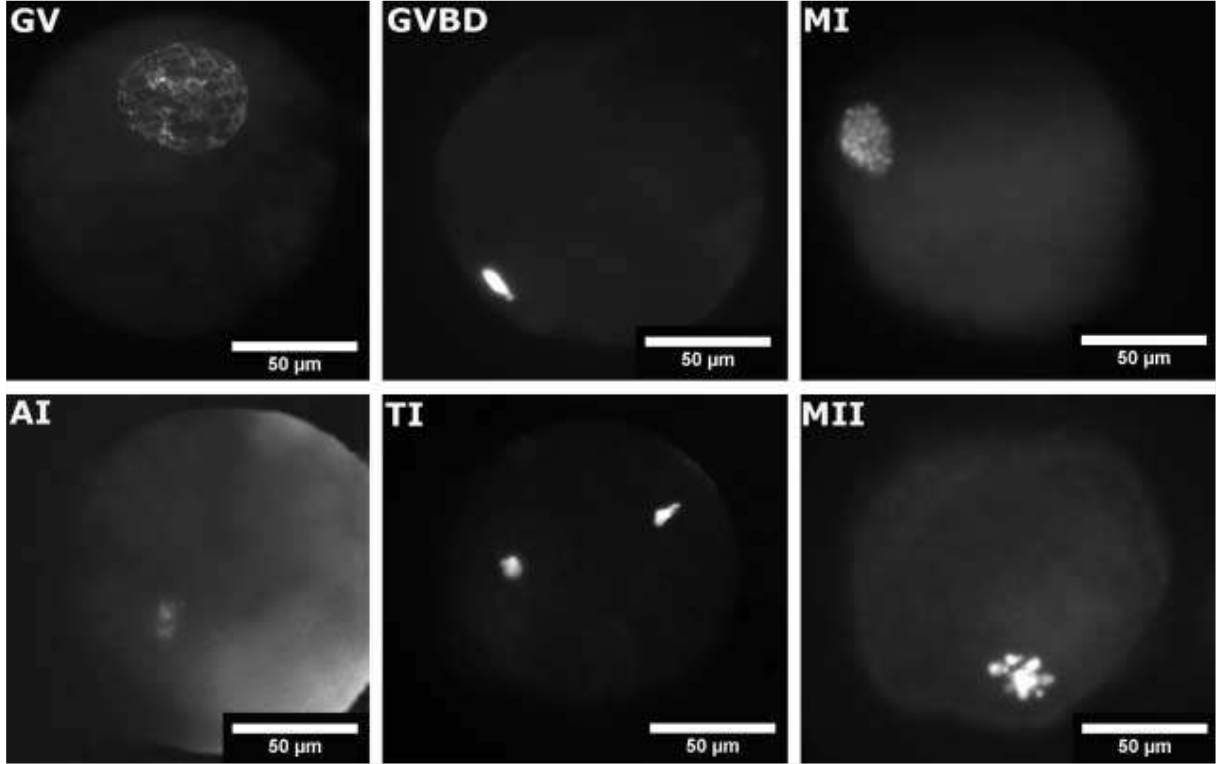
Doğumda memeli oositi I.mayoz bölünmenin profaz evresinin diploten safhasındadır. Bu evre germinal vezikül evresi olarak bilinir. Puberteye kadar bu evrede aklır, pubertenin başlamasıyla FSH ve LH'ın folikül gelişimini uyarmasıyla, mayoz bölünme kaldığı yerden metafaz II evresine kadar devam eder [48].

Olgunlaşma sırasında çekirdek zarı katlanır, zardaki porlar kaybolur. Çekirdek zarı geride küçük keseler ve çift katlı zar parçacıkları bırakarak ortadan kaybolur [49]. Çekirdekçik sitoplazmayla temas eder etmez ortadan kalkar. Bu olaylar GVBD olarak bilinir. GVBD mayozun devam etmeye başladığının gözle görülebilen ilk sinyalidir [47]. Burada rol alan protein Cdk1'dir. Cdk1 aktive olduğunda çekirdek zarının iskeletini oluşturan laminin filamentlerini dimerlerine bölerek depolimerizasyonunu sağlar. Ayrıca çekirdek iç zarını ve çekirdek porlarını da fosforlayarak çekirdek zarını küçük parçalar halinde sitoplazmaya dağılmasını sağlar. GVBD, sitoplazmik maturasyon promotör faktörün (MPF) aktivasyonu ile

gerçekleşir. MPF'nin buradaki bir diğer fonksiyonu da kromozomların kondensasyonunu sağlamaktır. Sentez fazında DNA replikasyonundan sonra kohezin adlı moleküller kardeş kromatidleri birbirine tutturarak bir arada kalmalarını sağlar. Hücre M fazına girdiğinde kohezinler sentromer bölgesi dışında tüm kromozom boyunca ortadan kaybolarak yerini kondensin adı verilen proteinlere bırakır. Kromozomların yoğunlaşması tam olarak anlaşılammış olmasına rağmen kondensinlerin bunda anahtar rol oynadıkları bilinmektedir. MPF aktive olduğunda kondensinleri fosforlayarak aktif hale getirir. Bu olaylar sonucu kromozomlar yoğunlaşarak kısalır ve metafaz plağında yerini alır. İyice kondense olan kromozomlar, mikrotübülüs düzenleyici merkez (MTOC)'lerce oluşturulan mikrotübüllerin meydana getirdiği mayotik iğ ipliğine bağlanırlar. Bu aşamada metafaz evresine girilmiştir ve kromozomlar oluşturulan metafaz plağı üzerindedir. Homolog kromozomların ayrılması ve kutuplara göçü anafaz I sırasında gerçekleşir. Mikrotübüller homolog kromozomlara bağlanarak birbirinden ayırır. Her kromozom çiftinden biri bir yavru hücreye gider. Kardeş kromatidler ise birbiriyle birleşik durumlarını sürdürür [50].

Telofaz I' (T1) de kromozomlar her iki kutupta ve çekirdek zarıyla çevrili durumdadır. Memeli oositleri asimetrik sitokinez süreci ile geneti materyalin yarısını birinci kutup cisimciği olarak dışarı atar. İkinci mayoz bölünme DNA replikasyonu olmaksızın, gerçekleşir ve oosit MII'ye ulaşır. Oosit MII evresinde tekrar beklemeye geçer. Bu bekleme aşamasına MII duraklama adı verilir. II. mayoz ancak fertilizasyon gerçekleşirse tamamlanır [51].

Nükleer olgunlaşma meydana gelirken aynı anda sitoplazik değişiklikler meydana gelir. Bu değişiklikler oositi fertilizasyona hazırlar.



Şekil 2.1. Mayoz bölünmenin farklı evrelerinde köpek oositinin floresans mikroskop görüntüsü [52]

2.3. Mitokondriyon

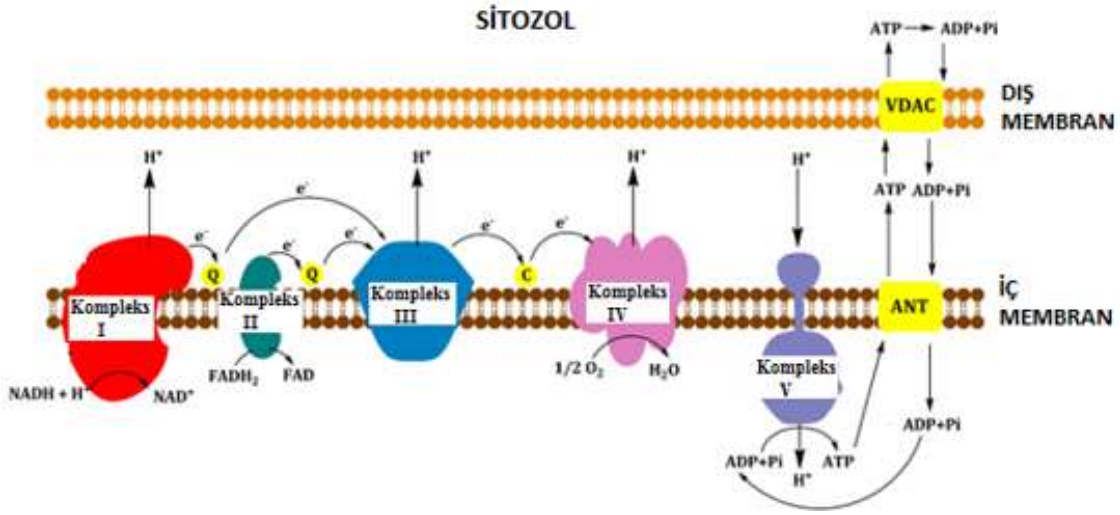
Mitokondriyonlar, küre, çomak, filament ve sarmal şekilli olabilirler. Mitokondriyonlar, çift zara sahiptir. Matriksi çevreleyen iç mitokondriyon zar ve sitoplazmaya yakın olan dış mitokondriyon zar. Bu iki zar arasındaki alan, intermembran aralık olarak adlandırılır. Mitokondriyon dış zarı, 6-7nm kalınlığında, voltaj-bağımlı anyon kanalları içeren düz bir zardır. Yaklaşık 3nm çapındaki bu büyük kanallar, en fazla 5 000 dalton olan, yüksüz moleküllere geçirgendir. Bu küçük moleküller, iyonlar ve metabolitler intermembran aralığa geçebilirler ancak iç zara geçemezler. Mitokondriyon iç zarı dış zardan daha incedir. Mitokondriyon iç zarı matriks içine doğru kıvrıntılar yaparak, yüzey alanını arttıran, kristalar şeklinde düzenlenmiştir Steroid metabolizmasında yer alan bazı hücrelerde, iç zar tübüler veya veziküler bir form oluşturarak matrikste yer alır. İç zar, zardan iyonları geçirmeyen fosfolipid kardiolipinden zengindir. Kristayı oluşturan zar proteinlerinin üç önemli görevi vardır: elektron-taşıma zincirinin oksidasyon reaksiyonunu gerçekleştirmek, adenosin trifosfat (ATP) sentezi, metabolitlerin matriks içine ve dışına taşınmasının düzenlenmesi. Solunum zincirinin enzimleri iç zara bağlıdır ve

baş kısımları matrikse uzanır. Geçirimli elektron mikroskop (TEM) 'de bu enzimler tenis raketi-şeklinde gözlenir ve elementer partiküller olarak adlandırılırlar. Elementer partiküllerin başları yaklaşık 10nm çapındadır ve oksidatif fosforilasyonu yürüten ve ATP üreten enzimleri taşırlar. İntermambran aralık, iç zarda üretilen ATP için gerekli özgün enzimleri içerir. Bu enzimler belirli kinazlar, adenilat kinaz ve sitokrom c 'dir.

Mitokondriyal matriksi, mitokondryon iç zarı tarafından çevrenir. Martrikte, sitrik asit döngüsünde ve yağ asitlerinin beta-oksidasyonunda yer alan enzimler bulunur. Matriksin başlıca ürünleri CO₂ ve indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotit (NADH)'dır. NADH, elektron taşıma zinciri için elektron kaynağıdır. Matrikste, mtDNA, ribozomlar ve taşıyıcı ribonükleik asit (tRNA)'lar da bulunur [41].

2.3.1. Mitokondriyonlarda oksidatif fosforilasyon

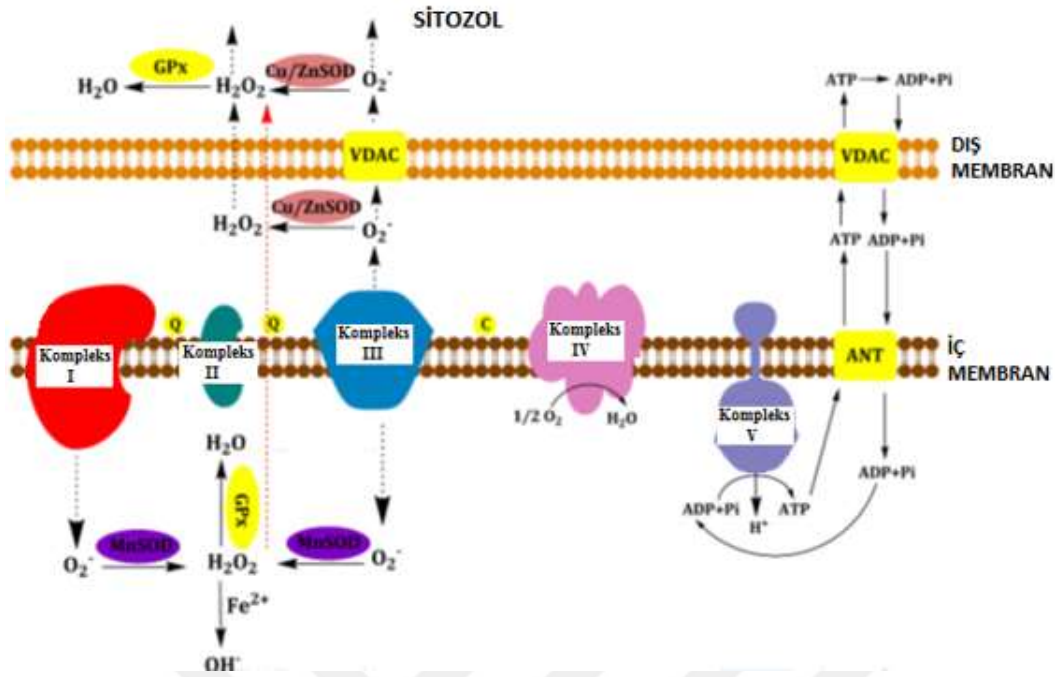
ATP sentezi, oksidatif fosforilasyonla veya elektron taşıma sistemi (ETS) ile gerçekleşir. ETS, iç mitokondriyon zarında gerçekleşir ve beş protein kompleksi içerir. ATP üretimi için, sitrik asit veya trikarboksilik yoluyla karbonhidratlardan, beta oksidasyonu ile proteinlerden ve yağlardan elde edilen indirgenmiş kofaktörler NADH ve flavin adenin dinükleotid (FADH₂) 'den elektronlarını, kompleks 1' den kompleks 2'aktarırlar. Bu elektronlar sırasıyla koenzime Q (CoQ) ya geçerek CoQH ve sonrasında CoQH₂ oluştururlar. CoQH₂ elektronlarını kompleks III'e transfer eder, kompleks III de sitokrom c' ye transfer eder. Bu elektronlar, sitokrom c'den kompleks IV'e geçerler. Kompleks IV'de elektronu, oksijene vererek su üretimi olur. Enerji, kompleks I, III ve IV tarafından kullanılan elektronların akışıyla serbest bırakılır. Protonlar, mitokondriyon iç membrandan, membranlar arası aralığa pompalanır. Bu proton gradienti, mitokondriyal membran potansiyeli yaratır ve kompleks V, adozin difosfat (ADP) ve inorganik fosfattan ATP üretir. ATP mitokondriyonu, sitozolik ADP taşıyıcısını kullanarak, adenin nükleotid taşıyıcısı aracılığı ile terk eder [53-55].



Şekil 2.2. Oksidatif Fosforilasyon [56]

2.3.2. Mitokondriyonlarda ROS üretimi

Oksidatif fosforilasyon sırasında, mitokondriyonda endojen ROS üretilir. Kompleks I ve III deki fazla elektron, direkt olarak oksijene transfer olabilir ve superoksit anyon oluşabilir. Superoksit anyon matrikte, matriks enzimi manganez superoksit dismutazla veya membranlar arası aralıkta, sitozolik enzim bakır/çinko tarafından, hidrojen peroksit'e dönüştürülür. Hidrojen peroksit, süperoksit anyondan daha kararlıdır ve sitoplazma ve çekirdeğe diffüze olarak, redoks-duyarlı sinyali aktive edebilir. Hidrojen peroksit, mitokondriyonda ve sitoplazmada glutatyon peroksidaz tarafından, peroksizomlarda katalaz tarafından suya indirgenebilir. İndirgenmiş geçiş metallerinin varlığında, hidrojen peroksit, hidroksil (OH⁻) radikaline dönüştürülür. OH⁻ en reaktif ROS'dur [55, 57-59]. ROS' lar yüksek reaktif moleküllerdir ve oksidanlar gibi davranarak elektronları, DNA'dan, proteinlerden, lipitlerden ve diğer moleküllerden alabilirler. Oksidatif hasarla sonuçlanabilen ROS aktivitesi, proteinlerin inaktivasyonu, biyolojik zarların bütünlüğünün bozulması ve genotoksisite ile sonuçlanır. Yüksek seviyede ROS, apoptotik veya nekrotik mekanizmalarla hücre ölümünü tetiklerken, düşük seviyede ROS, hücrede sinyal molekülü olarak görev alır [60-62].



Şekil 2.3. Mitokondriyon ROS üretimi [56]

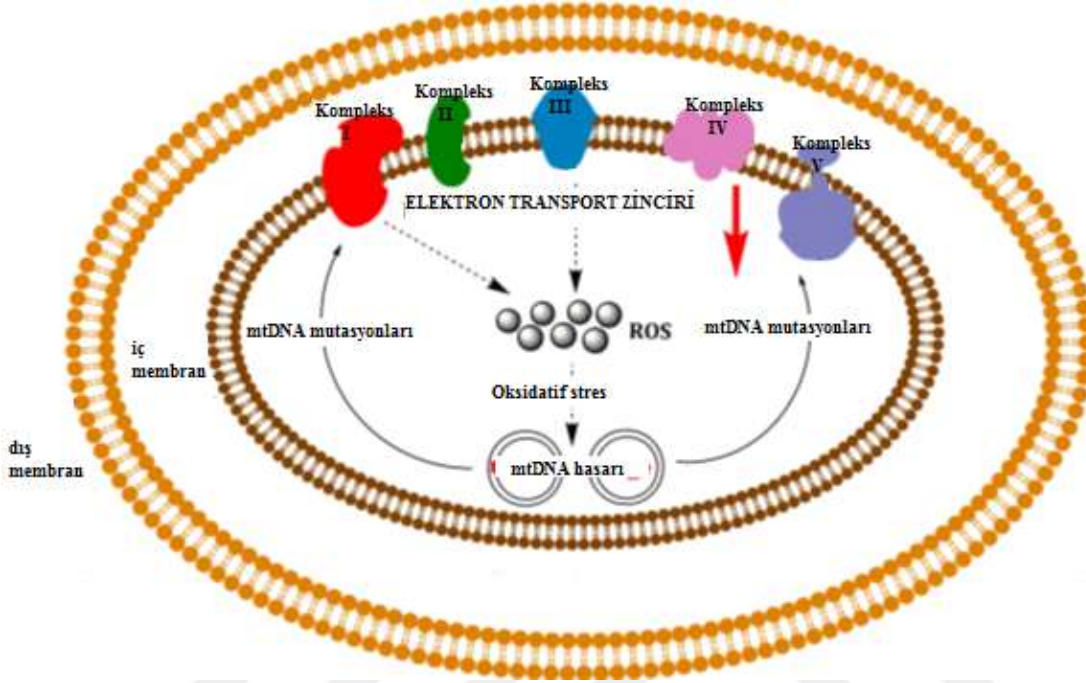
2.3.3. Mitokondriyon ve yaşlanma

Oksidatif stres teorisinde normal fizyolojik koşullar altında, aerobik organizmaların hücrelerinde kronik derecede oksidatif stres bulunduğu belirtilir. Bunun nedeni prooksidanlar ile antioksidanların dengesizliğidir. Bu dengesizlik, oksidatif hasarın sabit düzeyde birikmesiyle sonuçlanır. Oksidatif hasar yaşla birlikte artar ve bu artış çeşitli hücresel işlemlerde fonksiyon kaybına neden olur [63]. Bu teorisin başka bir versiyonu da mitokondriyal teoridir.

Mitokondriyal teori, mitokondriyonun yaşlanmaya katkısı olarak öngörülen 'kısır döngü' olarak tanımlanır. Mitokondriyonlarda üretilen ROS'un fosfolipidlere, proteinlere ve nükleik asitlere zarar vermesi sonucunda mtDNA mutasyonları meydana gelir ve bu durum işlevsel olarak hasarlı solunum zinciri alt ünitelerinin sentezlenmesine yol açar [64].

ROS'lardan kaynaklanan fonksiyon bozukluğu, membran potansiyelinde ve ATP sentezinde azalmaya neden olur. Oksidatif hasara bağlı mutasyonlar artarken, hasardan kaynaklı koruyucu ve onarıcı proteinlerin azalması, mitokondriyonların mutasyona yatkınlığını artırarak hücresel yaşlanmayı hızlandırır [65]. En fazla enerji gereksinimi olan doku ve organlardan; sinir sistemi, kalp ve iskelet kası,

böbrekler ve hormon üreten dokular, bu süreçten en fazla etkilenenlerdir. Hücre, doku ve organların etkinliğinin düşmesi, yaşlanma ve dejeneratif hastalıkları tetikleyebilir [66, 67].



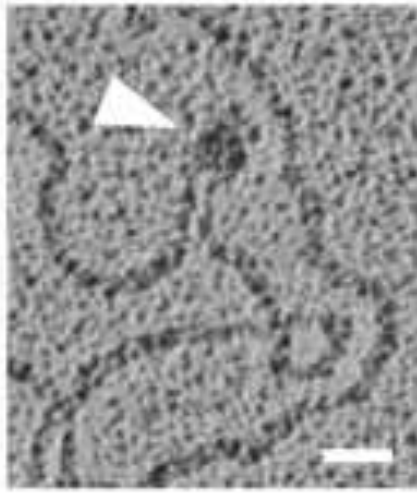
Şekil 2.4. ROS tarafından indüklenen mtDNA hasarı [56]

2.3.4. Mitokondriyal DNA yapısı

Mitokondriyonların kendilerine ait DNA'ları vardır. İnsan mtDNA'sı maternal olarak kalıtsaldır. Mitokondriyon genomu 16,6 kilobaz uzunluğunda, dairesel, çift zincirlidir. Çift zincirli mtDNA zincirinde Guanin ve Timin baz içeriğinin farklılığı, bu zincirlerin ağır ve hafif zincir olarak ayrılmasına neden olur [68]. mtDNA'da içteki daire, pirimidinden zengin hafif zincir, dıştaki daire pürinden zengin ağır zincirdir [69]. mtDNA'da genler arasında aralık bulunmaz ve intron içermez [70,71].

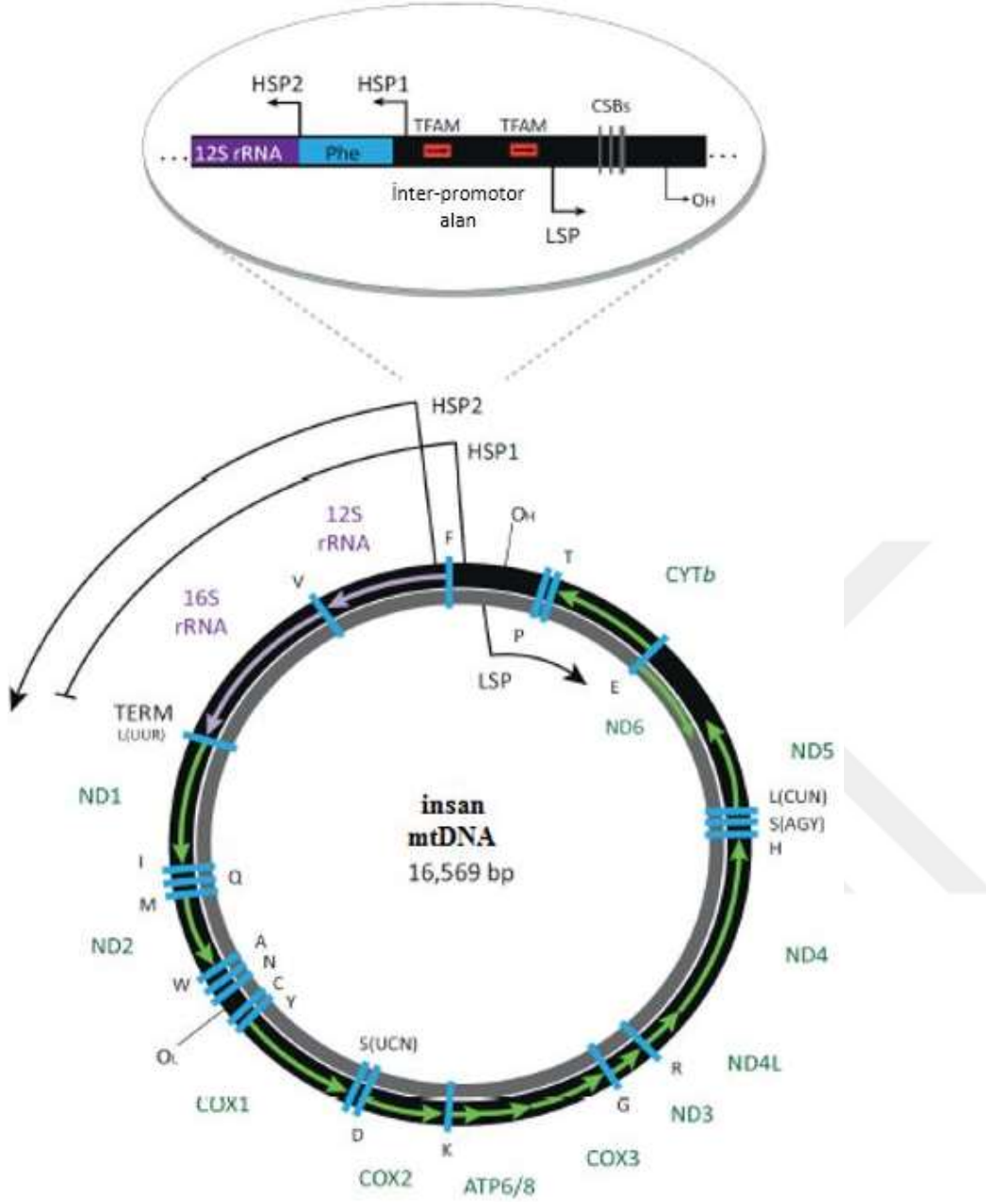
mtDNA, nükleoidler olarak adlandırılan protein-DNA kompleksleri şeklinde matrikste organize olmuştur[72].Nükleoidler memelilerde, yaklaşık 100nm'dir.Nükleoidler histondan yoksundur ve mtDNA kopyaları içerir. Mitokondriyal genomunun histonlardan yoksun olması mtDNA'nın nDNA'ya oranla yaklaşık 10 kat daha fazla mutasyona yatkın olmasına neden olur [73-75].

Nukleoidler, TFAM tarafından sıkıca paketlenirler. TFAM, yüksek mobiliteli grup (HMG) aile üyesi bir proteindir ve mtDNA'yı tamamen sarar. TFAM, nükleoid oluşumunda ve mtDNA bütünlüğünde son derece önemli rol alır [76].



Şekil 2.5. TFAM mtDNA Elektron mikroskop görüntüsü [72]

mtDNA da, 28 tanesi ağır zincirde, 9 tanesi hafif zincirde olmak üzere toplam 37 gen kodlanır. mtDNA, oksidatif fosforilasyonda yer alan yaklaşık 92 proteinin, 13 tanesini kodlar. Bunlar yapısal olarak oksidatif fosforilasyon enzim kompleksinin alt birimleridir. Solunum zincirinde yer alan genlerin bir çoğu mtDNA'da kodlanır sadece kompleks II alt ünitesi nDNA tarafından kodlanmaktadır [77]. Bunlar içinde, 7 tanesi NADH dehidrogenaz alt üniteleri (ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5, ND6) kompleks I'e, 3 tanesi sitokrom C oksidaz (COI, COII, COIII) kompleks IV'e, 2 tanesi (ATP6, ATP8) kompleks V'e ve 1 tanesi sitokrom b, de kompleks III'e aittir, 24 tanesi de olgun RNA ürünleridir [78].



Şekil 2.6. İnsan mitokondriyon genomunun şekli [79]

mtDNA'nın replikasyon ve transkripsiyonu nDNA tarafından kodlanan genler tarafından kontrol edilir. Mitokondriyonlarda yer aldığı bilinen tek polimeraz [80], polimeraz gamma (POLG)'dir. mtDNA'da yerdeğıştiren-lop (D-lop) ad verilen, kodlanmamış, replikasyon ve transkripsiyon başlatıcı bölgeler içeren bir bölge bulunur [81]. mtDNA zincirlerindeki replikasyon başlatıcı alanlar ağır ve hafif zincirler için sırasıyla OH ve OL olarak adlandırılır.

mtDNA'lar proteinlerini, mitokondriyon matriksinde yer alan mitoribozomlarda sentezlerler [82]. Mitoribozomlar sitoplazmada bulunan ribozomlardan farklıdır, çok daha az RNA içerirler. Mitoribozomların 12S ve 16S'lik rRNA'ları mt DNA tarafından kodlanır[83].

mtDNA lezyonları ve hasar tipleri

mtDNA sürekli olarak iç veya dış kaynaklı zararlı ajanlara etkin kalır. Başlıca 5 tip mtDNA hasarı vardır:

1. Alkilasyon hasar: Bu tür hasarlar kemoterapik ajanlar gibi ekzojen ve DNA'yı metilleyebilen S-adenozilmetiyonin gibi endojen kaynaklı olabilirler [84,85]. En önemlisi, mitokondriyon S-adenozilmetiyonin'dir[86]. Daha önce yapılan çalışmalarda endojen alkilasyon hasarı gösterilmiştir [87].

2. Hidrolitik Hasar: Bu hasar iki şekilde oluşabilir: Glikozidik bağların hidrolizi sonucunda abazik kısımların oluşumunda ve bazların hidrolitik deaminasyonu sonucunda, özellikle sitozin deaminasyonu, sonucunda oluşabilir [85,88].

3. Eklerin oluşumu: İki komponent arasında ek bir reaksiyon ürününün oluşması olarak tanımlanır[85]. Bu tür hasarlar östrojen gibi endojen ve sigara gibi ekzojen kaynaklara etkin kalınması sonucu oluşabilir.

4. Yanlış Eşlenmiş Bazlar: Replikasyon sırasındaki hatalardan veya modifiye bazların eşlenmesinden kaynaklanabilir [89].

5. DNA zincir kırıkları: Tek zincir kırıkları (SSBs) [90] ve çift zincir kırıkları olabilir [91]. Her iki tip hasar, zararlı ajanların direkt veya dolaylı olarak stimülasyonundan kaynaklanır.

6. *Oksidatif hasar*: En önemli ve en yaygın mtDNA hasar tipidir. Mitokondriyonlarda üretilen ROS, oksidatif hasarın kaynağıdır.

mtDNA tamir mekanizmaları

Mitokondriyon iç zarında, oksidatif fosforilasyon sırasında üretilen ROS'lar, endojen DNA hasarının ana kaynağıdır. mtDNA, mitokondriyon iç zarının çevrelediği matrikste yerleşiktir ve sürekli olarak oksidatif hasara etkin kalır [92]. mtDNA, nDNA'ya oranla 10 kat daha fazla mutasyon biriktirir. BER, alkalizasyon, deaminasyon veya oksidayon sonucun oluşan DNA modifikasyonlarının tamirinde kullanılan en iyi karakterize yolaktır. BER, nukleusta ve mitokondriyonlarda gerçekleşir. Mekanizmaları aynı olmasına rağmen, mitokondriyonlar bağımsız bir BER yolağına sahiptir. Nükleer ve mitokondriyal BER yolağı reaksiyon kaskadına dayanmaktadır. Buradaki amaç lezyonu uzaklaştırmak ve genomik bütünlüğü yeniden sağlanmaktadır. mtBER'in tüm komponentleri, nukleusta kodlanıp mitokondriyonlara gönderilir [93].

Baz ekzisyon tamiri (BER)

BER, kısa-yamalı BER (SP-BER) ve uzun-yamalı BER (LP-BER) olmak üzere iki alt yoldan oluşmaktadır ve her bir alt yolak 3 basamakta gerçekleşir: lezyon tanıma ve zincir kesimi, boşluk doldurma ve ligasyonla tamir tamamlanır [94].

Kısa yamalı-BER

BER yolağındaki ilk basamakta, hasarlı baz DNA glikozilazlar tarafından tespit edilir ve uzaklaştırılır. Tek fonksiyonlu ve çift fonksiyonlu olmak üzere iki tip DNA glikozilaz tanımlanmıştır. Mitokondriyonlarda tanımlanmış iki tane tek fonksiyonlu DNA glikozilaz vardır: Urasil-DNA glikozilaz 1 (UNG1) ve *Escherichia coli* MutY homologu (MYH) yer alır [95-97]. UNG; ilk tanımlanan glikozilazdır ve DNA'dan, sitozinin deaminasyonu sonucu meydana gelen veya dUMP'nin yanlış eşlenmesiyle meydana gelen Urasili uzaklaştırır [98]. MYH, DNA replikasyonu sırasında, 8-oxoG'nin karşısına yanlış eşlenmiş adeninin çıkarılmasında görevlidir.

Tek fonksiyonlu glikozilazlar tarafından modifiye bazların tanınması ve çıkarılmasının ardından pürin veya pirimidini uzaklaştırılmış, apürinik/apirimidinik (AP) olarak tanımlanan, abazik bir bölge oluşur. AP kısmı, 5' lezyon ucundan AP endonükleaz1 (APE1) tarafından kesilerek, 3'OH ve bloke 5'-deoksiribozofosfat (dUP) grubu kalır [99]. 5'-deoksiribozofosfat grubu uzatılamaz ve daha ileri işlenmesi gerekir. AP endonükleazlar, DNA'nın yeniden sentezi veya ligasyonu için, uygun DNA uçları meydana getirmek için görevli enzimlerdir. APE'nin memeli dokularında tanımlanmış iki tane izoformu vardır: APE1 ve APE2. APE1, memeli hücrelerinde mitokondriyon ve çekirdekte gerçekleşen BER'de yer alan başlıca endonükleazdır [100].

Tekfonksiyonlu DNA glikozilazların aksine, çift fonksiyonlu DNA glikozilazlar instrinsik olarak AP-liyaz aktivitesine de sahiptirler. Çift fonksiyonlu glikozilazlar, hasarlı bazı tanırlar, hasarlı bazdan N-Glikozilik bağı keserek uzaklaştırılır, bunlara ek olarak meydana gelen AP kısmını β -eliminasyonu veya β,δ -eliminasyon reaksiyonlarıyla keserler [101]. β -eliminasyonu sonucunda, AP kısmında 3' fosfo- $\alpha\beta$ -unsaturated aldehit ve 5'fosfat (5'P) 'li tek zincir kırığı bırakırken, β,δ -eliminasyonu, 3'P ve 5'P son uçlu, tek nükleotidlik bir boşlukla sonuçlanır. Her iki durumda da son uçlar uzatılamaz ve daha fazla işlenmesi gerekir.

Memeli mitokondriyonunda bilinen 4 tane çift fonksiyonlu glikozilaz vardır bunlar: 8-oxoguanine DNA glikozilaz-1 (OGG1), *E. coli* endonuclease III homologu NTH1, Nei-like DNA glikozilaz 1 ve 2 (NEIL1 ve NEIL2) glikozilazlardır [98,102]. Bunlardan OGG1 ve NTH1, β -liyaz aktivitesine sahiptir, NEIL1 ve NEIL2 ise β,δ -liyaz aktivitesine sahiptir.

BER'in ilk basamak ürünü bir tane tek zincir kırığıdır, bu SSB'in, 3' veya 5'uçlarındaki engelleyici grupların uzaklaştırılması gerekir. Ancak o zaman uzaklaştırılan hasarlı bazın yerine doğru baz yerleştirilir ve ardından ligasyon gerçekleşir.

Tek fonksiyonlu glikozilazlar UNG1 veya MUTYH1, APE1 tarafından gerçekleştirilen reaksiyon sonucu meydana gelen mtDNA'daki çentik 3'OH ve 5'

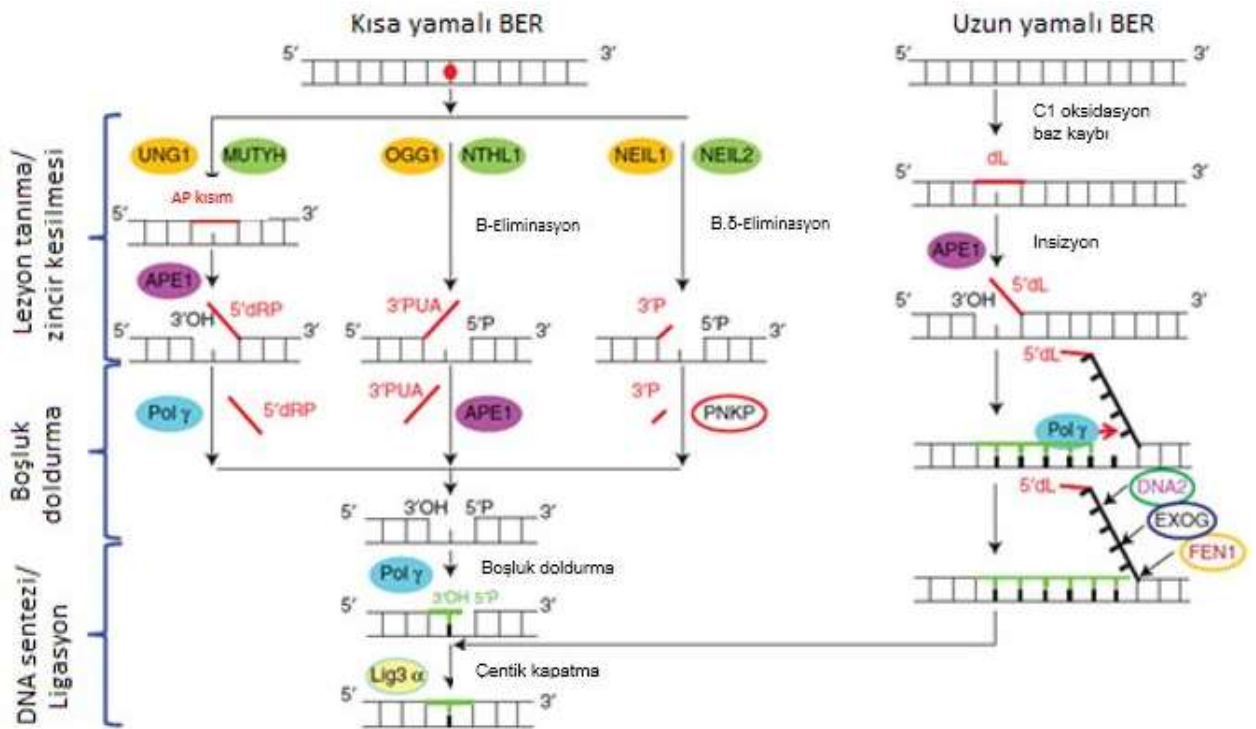
deoksiribozofosfat (5'-dRP) son uçlarına sahiptir. 5'-dRP grubu mitokondriyal polimeraz γ (Pol γ)'nın dRPliyaz aktivitesi sayesinde uzaklaştırılır. Bu polimeraz, mtDNA'nın hem replikasyonunda hemde tamirinde yer alır ve DNA polimeraz, 5'-3' ekzonükleaz ve dRP-liyaz aktivitelere sahiptir [103]. Bu basamağın son ürünü 5'P ve 3'-OH gruplarına sahip tek-zincir boşluğudur. Çift fonksiyonlu glikozilazlar/ β -liyaz aktivitesine sahip, OGG1 ve NTH1 tarafından meydana getirilen, mtDNA'daki tek zincir kırığı, 5'P ve 3'PUA son uçlarına sahiptir. 3'PUA grubu, APE1'in fosfodiesteraz aktivitesiyle uzaklaştırılır [94]. Oluşan son ürün, 5'P ve 3'OH gruplarına sahip bir tek-zincir boşluğudur. Çift fonksiyonlu DNA glikozilazlar/ β , δ -liyaz aktivitesine sahip, NEIL1 ve NEIL2 tarafından meydana getirilen mtDNA'daki çentik 3'P ve 5'P son uçlarına sahiptir. 3'P ucu, pöinükleotid kinaz 3'-fosfotaz (PNKP) tarafından uzaklaştırılarak 3'-OH ucu meydana getirilir [104]. Son ürün yine 5'P ve 3'-OH gruplarına sahip tek- zincir boşluğudur.

SP-BER'de boşluk düzeltme sürecinden sonra, elde edilen ürün 5'P ve 3'-OH gruplarına sahip tek bir nükleotidlik boşluktur. Bu boşluk DNA pol γ , tarafından doldurulur ve kalan çentik DNA ligaz III (LiG3) tarafından kapatılır.

Uzun yamalı-BER (LP-BER)

Uzun yamalı- BER'de belirli 5' bloke grupların, örneğin 5'deoxyribonolactone (5'-dL) pol γ 'nın dRP-liyaz aktivitesiyle etkili bir şekilde uzaklaştırılmaz. 5'dL lezyonunun meydana gelmesi glikozilaz aktivitesiyle ilişkilendirilemez çünkü bu şekilde bir lezyonda, hidrojen ayrılması ve deoksiriboz C1'in oksidasyonu sonucunda baz kaybı meydana gelmiştir. Bu tür bir lezyonun nDNA'da tamiri LP-BER ile gerçekleşir ve benzer şekilde mitokondriyonlarda da uzun yamalı BER kullanılır. SP-BER sürecinde, oluşan boşluğa Pol γ tarafından tek bir nükleotid eklenirken, LP-BER'de fazla sayıda nükleotid eklenebilir. LP-BER, biraz daha komplekstir ve fazla sayıda çeşitli nükleotidlerin yerleştirilmesi, orijinal DNA zincirinde çıkıntılı yapıların oluşmasıyla sonuçlanabilir. LP -BER sürecinde 5' bloke gruplar, 3'OH ucundan başlayarak pol γ tarafından nükleotid eklenmesiyle uzatılarak meydana getirdiği çıkıntılı yapılarla yer değiştirir. Bu nedenle de bu yapıların düzeltilmesi için farklı enzimlere gereksinim duyulur [105].

Mitokondriyonlardaki bu yapı 6-9 nükleotid uzunluğundadır ve flap endonükleaz 1 (FEN1) ve DNA2 veya endonükleaz G-benzeri (EXOg) tarafından uzaklaştırılması sonucu meydana gelen çentik LiG 3 tarafından kapatılır [106]. EXOG, bir 5' ekzo/endonükleaz olup, mitokondriyon LP- BER'de, DNA 5' ucundaki bloke grupları uzaklaştırır [107]. İnsan mitokondriyonlarında, DNA2'nin Pol γ ile etkileşim halinde olduğu ve onun DNA sentez aktivitesini stimüle ettiği saptanmıştır [108]. İnsan HeLa hücre mitokondriyonunda, FEN1'in, bir DNA2 ile etkileşim halinde olduğunu belirtmiştir [109].



Şekil 2.7. Mitokondriyon BER [110]

BER'de yer alan diğer proteinler

Tümör supressör protein (p53)'ün, ROS üretimindeki artışa yanıt olarak, mitokondriyona gittiğine dair veriler vardır. p53, 3'-5' ekzonükleaz aktiviteye sahiptir bu aktiviteyle, okside bazları hidrolize edebilir. Bunlara ek olarak, in vitro olarak p53'ün, glikozilaz bağımlı urasil ve 8-oxoG'nin uzaklaştırılmasında ve pol

gamma1-yürütücülü nükleotid birleşmelerini stimüle ettiği gösterilmiştir [111-113]. En son çalışmalarda DNA hasarının olmadığı insan fibroblastlarında, p53 ve ATP-bağımlı RecQ helikaz-benzeri 4 (RECQL4)'ün birlikte mitokondriyal nükleoidlerinde lokalize olduğu saptanmıştır. RECQL4'ün ekspresyonundaki azalma, mtDNA hasarında artışa yol açarak, RECQL4'ün mtDNA tamirindeki önemine işaret etmiştir. Böylece farklı kimyasal stresler kullanılarak, p53'ün, farklı koşullar altında, mitokondriyona geldiği belirtilmiştir [111-114]. BER'de yer alan diğer bir protein de, mtDNA paketleme proteini TFAM'dir. TFAM, oksidatif olarak hasara uğramış DNA'ya, hasarsız DNA'ya bağlandığından çok daha şiddetli bağlanır ve 8-oxoG'ye, OGG1 ve MYH'den daha fazla affinite gösterir [115,116]. Bunlara ek olarak, TFAM, OGG1, UNG1 ve APE tarafından invitro insizyonları inhibe eder [116]. Bütün bu gözlemlerle birlikte, TFAM'in mtDNA tamirini azalttığı önerilir. TFAM-yönetmeli DNA tamir inhibisyonu, oksidatif strese yanıtta önemli rol oynayabilir [111].

DNA zincir kırıkları tamiri

Tek zincir kırıkları ROS'un indüklediği, okside deoksiribozun parçalanması sonucu meydana gelir. ROS'lar DNA bazlarına direkt olarak hasar vererek en yaygın DNA hasar tipi olan DNA tek zincir kırıklarına neden olabilirler. BER sürecinde ara basamak olarak tek zincir DNA kırıkları meydana getirilir. Tamir edilemeyen tek zincir DNA kırıkları, çift zincir DNA kırıklarına dönüşebilir [117]. Nükleus ve mitokondriyonlarda, tek zincir kırıkları bir BER alt yolağı olan tek zincir kırık tamir yolağıyla tamir edilir. BER ve tek zincir kırık tamir yolağı ileri basamaklarda ortak enzimler içerirler. Tek zincir kırık tamiri, hasar tanıma, hasarı düzenleme, DNA sentezi ve ligasyon olmak üzere 4 basamakta gerçekleşir.

1. Hasar tanıma:

Nükleusta tek zincir kırık tamiri, poly ADP ribose polymerase (PARP) ailesi proteinlerinden PARP1'in, tek zincir kırığını tespit etmesiyle başlar. PARP tek zincir DNA kırığına bağlandıktan sonra, poly ADP riboz (PAR) zincirlerini sentezler, bu zincirler DNA tamir proteinleri için bir sinyal niteliğindedir. PARP1'in mitokondriyonlarda yer aldığı saptanmıştır [118, 119, 120]. Bu Çalışmalar

sonucunda, PARP'ın mitokondriyonlarda bir izoformu olduğu ve tek zincir DNA kırıklarını tespit ettiği ve tamir kaskadını başlattığı belirlenmiştir. Kokayin sendrom A (CSA) ve kokayin sendrom B (CSB) proteinlerinin de, oksidatif streste mitokondriyonlarda biriktiği ve OGG1, mitokondriyal tek zincir bağlanma proteini ve mtDNA ile kompleks oluşturduğu saptanmıştır[121].



2. Lezyon düzenleme

mtSSBR'da lezyonların düzenlenmesi çok yeni bir süreçtir. Tek zincir kırıklarına başarısız veya verimsiz DNA ligaz aktivitesi de neden olabilir, bu tür kırıklar aprataksin ile tamir edilir. Lezyonun yanındaki kısımda meydana gelen yetersiz ligaz aktivitesi, mtDNA'nın 5' ucuna adenin monofosfat (AMP)'nin kovalent yapışmasına neden olur ve 5'-AMP oluşur. Bu ekler, aprataksin tarafından uzaklaştırılır. Aprataksin tek zincir kırıklarında, 5' AMP'yi uzaklaştırır ve DNA ligasyonu için gerekli olan 5'P'ı tamir eder [122]. Son yapılan çalışmalarda aprataksinin mtDNA bütünlüğünde önemli rolü olduğu ve aprataksin yokluğunun mtDNA kopya sayısında azalmaya ve DNA hasarında artmaya neden olduğu belirtilmiştir [123].

TOP-1 DNA ekleri DNA replikasyonu sırasında oluşabilir ve TDP1 ile tamir edilir. TDP1, TOP1'deki tirozil kısmıyla DNA 3' ucu arasındaki bağı hidrolize eder. TDP1 DNA 3' ucundaki fosfodiester bağına hidrolize eden ve 3'-fosfoglikolate, 3'-abazik kısımlar, 3'-nükleozidaz aktivitesi olmak üzere, genel olarak DNA'nın 3'- uçlarının düzenlenmesinde yer alan bir tamir enzimidir. TDP1 mitokondriyonlarda tanımlanmış, 3'-DNA uçlarının düzenlenmesinde yer alan, tek enzimidir. Tek zincir DNA kırık tamirinde TDP1, sensör gen olan PARP1 ile etkileşim halindedir [124]. TDP1 ayrıca mtDNA bütünlüğüne de katkıda bulunur. TDP1'den yoksun hücrelerde oksidatif hasarla indüklenmiş mtDNA hasarı birikimi gözlenmiştir [125].

Yapılan çalışmalar sonucunda, LP-BER'de, 5'bloke grupların daha ileri düzenlenmesinde, FEN-1 'in yer aldığı belirtilmiştir. Ortak lezyonların ve AP kısımlarının düzenlenmesi SP-BER ile tamir edilebilir ancak mitokondriyonlarda gerçekleşen LP-BER sürecinde fazla nükleotid eklenmesi sonucunda oluşan 5' çıkıntılı yapılar, FEN1'in endonükleaz aktivitesiyle uzaklaştırılır. LP-BER'in mitokondriyonlarda gerçekleştiği saptandıktan sonra, FEN1 mitokondriyon ekstraktlarında tespit edilmiştir [126].

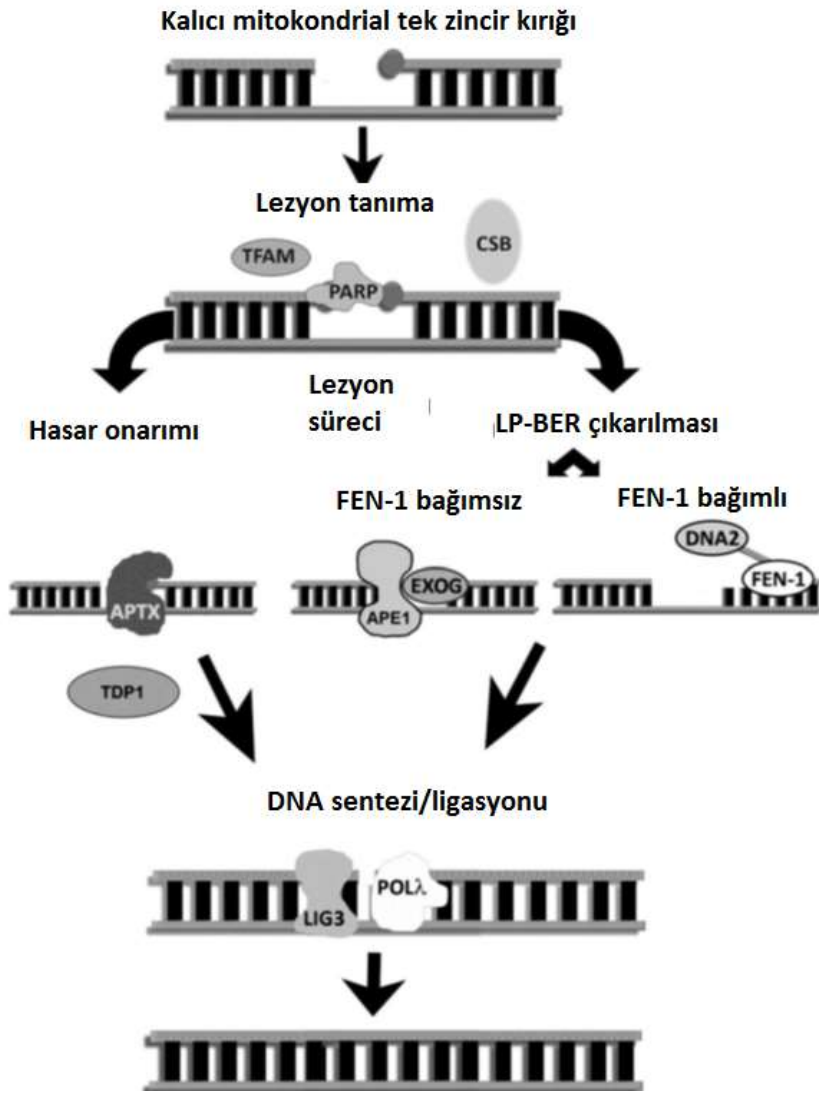
FEN1 varlığında veya FEN1 bağımlı yolak, diğer bir 5' ekzonükleaz enzim olan DNA2 tarafından desteklenir[127]. DNA2'de, 5' çıkıntılı yapıları keserek uzaklaştırır. Çok kısa zaman önce yapılan bir çalışmada DNA2'nin mitokondriyonlarda bulunduğu ve burada Pol γ ile etkileşime girerek Pol γ 'nın DNA sentez aktivitesini stimüle ettiği gösterilmiştir[125]. Araştırmacılar, FEN1 ve DNA' nin birlikte yer aldığı yolakta DNA tamir aktivitesinin 10 kat daha fazla arttığını göstermişlerdir. Sonuç olarak mitokondriyonlarda gerçekleşen FEN1 bağımlı yolağın her iki enzime gerek duyduğunu belirtmişlerdir.

mtDNA'da gerçekleşen LP-BER'de iki alt yolak içermektedir ilk alt yolak FEN1 bağımlı olup DNA2'de bu yolakta yer alır, ikinci alt yolak FEN1 bağımsız olup APE1 ve ligaz 3 kompleksiyle tamir tamamlanır.

EXOG, kuvvetli 5'–3' ekzonükleaz aktivitesine sahiptir [128]. EXOG, mitokondriyal LP-BER'de 5' uçlama sürecinde polimeraz γ , APE1 ve ligaz 3 ile kompleks oluşturarak yer alır. EXOG'un mitokondriyonlardaki varlığı LP-BER sistemine yeni bir bilgi eklemiştir. Fakat bu enzimin LP-BER'de hangi substratlar üzerinde aktif olduğu araştırılmalıdır. Mitokondriyonlarda FEN1 ve aprataksin ile ilgili bulgular, EXOG'un tamir edemediği durumlarda kullanılır.

4. Ligasyon

Tek zincir kırık tamirinin son basamağında, DNA fosfodiester iskeletinin yeniden ligasyonudur. DNA ligaz III'ün mitokondriyonlarda gerçekleşen bütün ligasyon aktivitelerinde yer aldığı saptanmıştır [129].



Şekil 2.8. mtDNA tek zincir kırık tamiri [124]

DNA çift zincir kırıkları tamiri

Nukleusta DNA çift zincir kırıkları , homolog olmayan rekombinasyon (NHEJ) ve homolog rekombinasyon (HR) olmak üzere iki yolakla tamir edilebilir [130]. Memeli mitokondriyonlarının da DNA çift zincir kırıkları tamiri yaptıklarına dair veriler vardır.

Homolog olmayan rekombinasyon

Homolog olmayan rekombinasyon tamir mekanizmasında hasarlı DNA zincirinin uçları komplementer diziyeye homolog olup olmadığına bakılmaksızın doğrudan bağlanır. Tamir sisteminin endojenik hata üretim mekanizmasıyla da küçük

delesyonların oluşumuna izin verilir. NHEJ'de, DNA-uç bağlama kompleksi KU, çift zincir kırık tamirinde görevlidir. Ku proteinin Ku70 ve Ku80 olmak üzere iki alt ünitesi vardır. KU, DSB'leri degradasyondan korur ve diğer tamir faktörlerinin fonksiyonlarını yerine getirmelerini kolaylaştırır. İlk aşamada, Ku70 ve Ku80 heterodimerik protein kompleksi, çift zincir kırığı oluşan DNA'ya sırasıyla yakın ve uzak uçlardan bağlanır ve onu ekzonukleotik yıkımdan korur. Ku heterodimeri serin/treonin aktivitesine sahip olan DNA-bağımlı protein kinaz (DNA-PK)'nin katalitik alt ünitesine bağlanır. X-ray tamir çapraz-tamamlama protein 4 (XRCC4)/ligaz4 kompleksi kırık uçlara bağlanır ama aktif değildir. Kırık uçların enzimatik yolla birbirine bağlanabilmesi için kırık uçların önceden modifiye edilerek hazırlanması gerekir. MRN kompleksi veya FEN1, kırık uçlardaki ligasyona engel oluşturan kısımları uzaklaştırarak ligasyon işlemine olanak sağlar. Hasarlı bölgedeki NHEJ faktörleri, DNA-PKcs'nin otoposforilasyonu ve/veya DNA-PK bağımlı fosforilasyonu ile hasarlı bölgeden uzaklaştırılır. Bu işlemlerin sonunda XRCC4/DNA ligaz 4 kompleksi aktifleşir ve zincirleri komplementer uçlardan birleştirir [131]. Memeli mtDNA'sında da NHEJ de yer alan proteinlerin bulunduğu ve nDNA dakiyle benzer olduğu önerilmiştir[130]. Memeli mitokondriyonunda MRE11'in mtDNA'ya bağlandığı tespit edilmiştir [132]. DNA-PK proteini fare mitokondriyonunda tespit edilmemiştir [133].

Homolog Rekombinasyon

Nukleusta birçok faktör DSB tamir yollarından birini seçmeyi etkiler [134]. HR onarım işleminde hasar tamiri, hücre döngüsünün S veya G2 fazlarında hasar görmemiş kardeş kromatidi kullanarak yapılır. Onarımın S veya G2 fazında gerçekleşmesinin nedeni, bu evrelerin kardeş kromatidin onarım için kalıp olarak kullanılabilir olduğu evreler olmasıdır. HR'de izlenen yol, hasarlı DNA'nın tamirinde, hasarlı olmayan DNA'nın kalıp olarak kullanılıp, doğru homolog dizinin eşleştirilmesidir [135]. HR'nin ilk basamağında, çift zincir kırıklarının uçları üç protein kompleksi, MRE11, RAD50 ve NBS1 (MRN kompleks; mayalarda MRX kompleks olarak da bilinir) tarafından tespit edilir [130]. nDNA'da, MRE11 kırık DNA uçlarına bağlandıktan sonra, DNA'nın tek zinciri EXO1 tarafından rezeksiyon edilerek, bir 3'ssDNA alanı meydana getirilir [136]. Bu işlem son dönemde tespit edilen, rezeksiyon promotör faktör CtIP tarafından asiste edilir. DNA uçlarının

işlenme sürecinin ardından oluşan 3'- tek zincir DNA alanı, replikasyon proteini A (RPA) tarafından kapatılır. RPA, memelilerde başlıca ssDNA bağlanma proteini. HRR sürecinde, bu proteinin fonksiyonlarından biri de ssDNA'yı korumak ve ikincil DNA yapılarının oluşumunu engellemektir. RPA ayrıca, dolaylı olarak Rad51 filament oluşumunu, DNA-Rad52 veya DNA-BRCA2 etkileşimini yürüterek kolaylaştırır [137]. Rad52 ve BRCA2 'de nükleasyonda önemli rol alır. Mayalarda RAD 52 fonksiyonu çok önemliken, memelilerde BRCA2, RAD52'in yerine geçer ve HRR'nin regülasyonunda önemli rol oynar. Rad51, RPA ile kaplı, 3'-tek zincir DNA alanıyla etkileşime girerek, Rad51 nükleoprotein filamenti meydana getirir. Nükleoprotein filamenti, homolog arama reaksiyonunda önemli rol alır. DNA zincirinin, homolog DNA çiftiyle ele geçirilmesinin ardından, Rad 54 ve homoloğu Rad 54B DNA sentezi ve branç migrasyonunu kolaylaştırarak Holliday bağlantıları oluşur [138]. DNA tamir sentezi sürecinde ise, hasarsız DNA molekülünden sekans bilgileri, hasarlı DNA'ya kopyalanarak hasarlı DNA'nın tamiri sağlanır. HRR'nin sonbasamağında, Holliday bağlantılar, çözücüler adı verilen protein kompleksleri tarafından çözülürler [139]. Holliday bağlantılarının çözücüler tarafından çözülmesi, gen değişimine veya cross-overe yol açar.

RAD51 [143] ve DNA2'nin [140] memeli mitokondriyonunda bulunduğu saptanmıştır ve EXOG'un da EXO1'in mitokondriyondaki eşleniği olabileceği düşünülmüştür. Bitki ve mantar mitokondriyonlarında homolog rekombinasyonun gerçekleştiğine dair birçok veri vardır. Bu veriler içinde en iyi karakterize Holliday junction-bağlanma ve çözme enzimlerinden örneğin *S. cerevisiae* da cruciform cutting endonuclease 1 (Cce1) tanımlanmıştır [141]. Ancak Cce1'e en yakın insan homoloğu TEFM, başlıca mitokondriyon transkripsiyonunu kolaylaştırmada yer alır [142]. Memeli mitokondriyonu homolog rekombinasyonun temel mekanizmasına sahip gibi görünmektedir [143]. Mitokondriyonda replikasyonu durdurmada ve sonlandırmada yer alan 3 protein tanımlanmıştır, mitokondriyal transkripsiyon sonlandırıcı faktör (mTERF), mTERF domain- 1 ve 4. Her durumda, mtDNA bütünlüğünün sağlanmasında rolleri vardır [116].

2.4. Oosit ve Mitokondriyon

Mitokondriyonların, oosit olgunlaşması ve embriyo gelişimi sürecinde dağılımı ve morfolojisi oositin veya embriyonun metabolizmasına, oksijen tüketimine, karbondioksit üretimine göre değişiklik gösterir [144].

2.4.1. Oosit ve erken embriyolarda mitokondriyonların yapısı

Türlere bağlı olarak, bir memeli oositinde yaklaşık 100 000-10 000 000 mitokondriyon bulunur ve bu sayı insanda 100 000'dir [145]. Oogenez sırasında mitokondriyonların sayısında artış olur, buna paralel olarak sitoplazmik hacim artar. Primordiyal germ hücrelerinde 100, oogonialarda 200, primer oositte 10 000 tane mitokondriyon bulunur. Mitokondriyonların sayısal artışına, yapısal değişiklikler eşlik eder. Küçük oositlerin mitokondriyonları, transverse düzenlenmiş, çok sayıda kristaya sahiptir. Büyüyen oositlerde mitokondriyonlar yuvarlak ve oval şekilli olup, kavisli kristalara sahiptir. Ovulasyonda, mitokondriyonlar küresel, immature, yüksek derecede vakuole, yoğun matriksli ve az sayıda kristayla karakterizedir. Zigot ve 2-hücreli embriyo evreleri arasındaki süreçte, mitokondriyonlar gulle şeklinde ve kristaları konsantrik yerleşimlidir. 4-hücreli evreden-marullaya kadar, mitokondriyonlar daha uzun yapıda, transverse kristalıdır. Bir insan blastosistinde toplam mitokondriyon sayısı 14 000 dir ve hücre başına düşen mitokondriyon sayısı yaklaşık 150'dir [146].

2.4.2. Gelişim evrelerine göre mitokondriyonların yeri ve dağılımı

Oosit olgunlaşması ve erken embriyogenez sürecinde mitokondriyonların dağılımında evreye özgü değişimler meydana gelir. Mitokondriyonların hücre içi düzenindeki değişim süreçleri hücre iskeleti elemanlarına bağlı olarak gerçekleşir. Fetal ovaryumlardaki oogonyumlarda ve primordiyal foliküllerdeki oositlerde mitokondriyonlar perinukleer alanda yer alır. Erken antral foliküllerde mitokondriyonlar periferik dağılım sergiler göstermiştir. GV oositlerde çok sayıda küçük mitokondriyonların kortekste ve GV'nin çevresinde bulunduğu saptanmıştır. GVBD'den anafaz I'e kadar süren mayotik süreç sırasında mitokondriyonlar perinukleer alanda lokalizedir. Nukleer membranın çevresindeki mitokondriyonlar

polarizasyon, oogenez ve fertilizasyon sırasında birçok kere yenilenir. Bunun nedeni nukleer materyalin düzenlenmesinde mitokondriyon aktiviteye özellikle ihtiyaç duyulmasıdır [147-148]. Pronukleer evrede pronukleusların çevresindeki mitokondriyon birikiminin simetrik olması segmentasyon bölünmeleri ile oluşacak her blastomere eşit sayıda mitokondriyon aktarılmasını sağlar. Mitokondriyonlar genellikle düz endoplazmik retikulum (DER) membranları ile ilişkilidir. DER ve mitokondriyon birlikte ooplazmanın kortikal alanına yayılmış çok sayıda ve sıklıkla büyük yapılar oluştururlar [148-150]. Mitokondriyonların dağılımı nukleer olgunlaşma için önemlidir.

2.4.3. Mitokondriyonların oositteki görevleri

Görevleri aynı olsa bile, oositlerde bulunan mitokondriyonlar yapısal olarak somatik hücrelerde bulunanlardan farklıdır. Mitokondriyonlar, oositlerde ATP üretimi ve hücrel homeostasinin devamlılığını sağlarlar. Mitokondriyonların sayısı ve aktivasyonu, düzgün oosit maturasyonu, fertilizasyon ve embriyo gelişimi için önemlidir [151]. Memelilerde oosit maturasyon aşamaları safhalarında mtDNA kopyaları 30 kat artar [152]. Bir primer oosit (20 mm) 500 kopya mtDNA ya sahiptir, MII oosit (80 mm) 150 000–700 000 kopya mtDNA ya sahip olabilir. Bu mtDNA kopya sayıları kişiden kişiye değişiklik gösterir. mtDNA kopya sayısının oosit kalitesi ve fertilitéyle ilişkilidir. Oosit maturasyonu sürecinde mitokondriyonların aktivitesi düzenlenir. Oosit maturasyonu sırasında mitokondriyon membran potansiyelinde önemli derecede artış gözlenir; bu duruma oksidatif fosforilasyondaki artış eşlik eder [153]. Oosit maturasyonu sırasında ATP seviyesi artar ve yüksek ATP seviyesine sahip oositlerin fertilizasyon oranları ve embriyo gelişimleri, düşük ATP seviyesine sahip olanlardan çok daha yüksektir [154].

Oosit yeterliliği yavru hücrelere mitokondriyon sağlanması açısından önemlidir. mtDNA replikasyonu ve mitokondriyal amplifikasyon preimplantasyonun ileri aşamalarına kadar gerçekleşmez, oositin mitokondriyon içeriği, embriyonun her bir hücresine yetecek kadar organel ve genom sağlamalıdır. Bu amplifikasyon sürecindeki duraksama, yetersiz kopya sayısına neden olur bu durumda embriyonun 7,5-8,5 günlerinde ölümüne yol açar [155]. Embriyonik hücre başına

düşen mitokondriyon dağılımı farklanmamış yarıklanma evresine kadar her bir embriyonik hücrede aynıdır. Geç morula- blastosis evresindeki hücrelerin farklılaşmasıyla mitokondriyonların dağılımı farklılık gösterir. Fare ve hamsterlarda yapılan çalışmalarda, trofoektoderm hücrelerinin, iç hücre kitlesine oranla daha fazla sayıda mitokondriyona sahip olduğu saptanmıştır [146]. Trofoektoderm hücreler, plasenta ve ekstraembriyonik dokulara farklandığı için daha fazla enerjiye ihtiyaç duyar ve mitokondriyon sayısı daha fazladır. Tam tersi, iç hücre kitlesindeki hücreler implantasyondan önce çok az ATP üretimine ihtiyaç duyar böylece dah az sayıda ve daha az aktif mitokondriyona sahiptir [156].

Memeli oositi ve erken embriyosu, enerji gereksinimini mitokondriyonlardan sağlar. İmmatür oositlerde sayıları az olsada mitokondriyonlar aktiflerdir [132]. Glikolizin alternatif enerji üretimi glikolitik enzim fosfofruktokinaz tarafından baskılanana kadar, enerji oksidatif fosforilasyonla sağlanır [133]. Oosit maturasyonunda, mitokondriyonlarda lipidlerin beta oksidasyonu gerçekleşir [134]. Olgun oositte ATP tüketiminde yüksek bir artış olur, bu durum olgun oositin normal fertilizasyona gidebilmesi için gereklidir. Oositin fertilizasyonunu takip eder, polar cisim oluşumunu ve kromozomların ayrılmasını içeren tüm basamaklarda enerjiye ihtiyaç vardır.

2.4.4. Oosit yaşlanması ve mitokondriyon ilişkisi

Oositte bulunan mitokondriyon maternal kökenlidir. Paternal mitokondriyon fertilizasyon sırasında spermatozoa ile ooplazmaya girse de ubikutin-bağlı proteoliz yolağı ile yıkıma uğrar. İleri yaştaki kadın oositlerinde mitokondriyonların fonksiyonlarındaki azalmanın, fertilitede azalmaya, düşük embriyo gelişimine ve düşük gebelik oranına yol açtığı saptanmıştır [157]. İleri yaştaki kadınların oositlerinde bulunan mitokondriyonlar genç kadınlardakine oranla, daha şişkin ve kristaları bozulmuştur [158]. Yaşlı fare oositlerinin mitokondriyonları, genç fare oositlerinin mitokondriyonlarına oranla 2,7 kat daha az sayıda mtDNA içermekte ve bu durum yaşlı farelerde fertilizasyon potansiyelinin azaldığını göstermektedir. Yaşla ilişkili mitokondriyon fonksiyon bozuklukları, oosit maturasyonuna, nukleer iğ iplikleri aktivasyonuna ve kromozomların ayrılmasına zarar vererek [136-140], anöploid oranında artışla sonuçlanabilir [141]. İleri yaştaki kadın oositlerinde

mtDNA'da nokta mutasyonlarının biriktiği ve yüksek düzeyde mtDNA delesyonları meydana geldiği saptanmıştır [159]. Bu faktörler, direkt olarak anöploididen ve zayıf implantasyon oranlarından sorumludur. Mitokondriyon fonksiyon bozukluklarının, post ovulatuvar yaşlı oositlerin fragmantasyonunda önemli rol oynadığı saptanmıştır [160]. İleri yaştaki kadın oositlerinde fertilité potansiyelinde azalma başlıca oksidatif stresin neden olduğu mitokondriyon hasardan kaynaklandığı belirtilmiştir [161].



3. GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmamız TÜBİTAK tarafından desteklenmiş olup, deney aşaması New York Medical College Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Moleküler Üreme ve Fertilite Koruma Laboratuvarında, Prof. Dr. Kutluk Oktay'ın gözetimi altında yapıldı. Çalışmada kullanılan 10 adet, 3-4 aylık, genç ve 10 adet, 9-12 aylık, yaşlı dişi, FVB fareler, New York Medical College Hayvan Bakım ve Kullanım Kurum'undan temin edildi. Çalışmamızda Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR) ile immünofloresan yöntemleri kullanılarak yaşın oosit mitokondriyonu üzerine etkisi araştırıldı. Çalışmamız yetersiz elde edilen qRT-PCR sonuçlarından dolayı, 5 adet genç ve 5 adet yaşlı fare ile tamamlandı.

3.1. Farelerde Ovulasyon İndüksiyonu ve Oositlerin Toplanması

Genç ve yaşlı farelerde ovulasyon indüksiyonu her bir fareye 5IU pregnant mare serum gonadotropinin, intraperitoneal enjeksiyonu ile yapıldı [37]. Uygulamadan 15 saat sonra fareler servikal dislokasyon ile sakrifiye edildi. Her bir farenin ovaryum dokuları alınarak M199 (CORNING, Mediatech, VA, USA) medyum içeren petri kaplarına aktarıldı ve uygun iğnelerle oositler mekanik olarak izole edildi. Her bir fareden elde edilen oositlerden bir tanesi, qRT-PCR yönteminde kullanılmak üzere önce sıvı nitrojene, ardından -80 °C'ye konularak kullanıma hazır halde bekletildi. Genç ve yaşlı farelerden toplanan oositlerin bir kısmı da immünofloresan tekniğiyle incelenmek üzere, %4'lük paraformaldehite aktarılarak fikse edildi.

3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ve Gerçek Zamanlı PCR Hakkında Genel Bilgi

PCR yönteminin Kary Mullis tarafından 1985 yılında tanımlanmasından sonra nükleik asit amplifikasyon yöntemleri hızla tanı laboratuvarlarına girmiştir. PCR yöntemi, nükleik asitlerin in vitro olarak çoğaltılmasını ve böylece yüksek duyarlılıkta saptanmasını sağlayan bir yöntemdir. Bir başka deyişle, canlı bir hücre içinde gerçekleşen DNA replikasyonu, PCR yönteminde bir tüp içinde taklit edilir. In

vitro DNA çoğaltması için gerekli sıcaklık kontrolü “thermal cycler” denilen otomatize ısı kontrol cihazlarında gerçekleştirilmektedir.

PCR üç değişik sıcaklıkta çalışan basamakların bir döngü halinde tekrarlanması ile gerçekleştirilir. İlk basamak denatürasyondur ve 94- 96°C’ ısıtılan DNA’nın iki zincirinin birbirinden ayrılması söz konusudur. İkinci basamak birleşmedir. Sıcaklığın düşürülmesi ile primerler çoğaltılacak bölgenin uçlarında yer alan kendilerine özgül dizileri tanıyarak hidrojen bağları ile bağlanırlar. Primerlerin özgül olarak bağlanması için kullanılan sıcaklık genellikle 50 ile 70 °C arasındadır. Üçüncü basamak polimerizasyon ya da sentez aşamasıdır. Reaksiyon karışımı sıcaklığa dirençli DNA polimerazın çalıştığı optimum sıcaklık olan 70 °C’ye getirildiğinde, primerlere bağlanan enzim molekülleri dizinin 3’ ucuna kalıp DNA’ya uygun nükleotitleri ekleyerek DNA sentezi yaparlar. Bu üç basamak bir döngüyü oluşturur ve her tekrarlanışta iki primer arasında kalan özgül DNA parçasının birer kopyası çıkartılarak başlangıçtaki DNA miktarı her döngüde geometrik olarak çoğaltılır. Çoğaltılan DNA parçalarının (amplikon) gösterilmesi için agaroz ya da poliakrilamid jel elektroforezi yapılır. Elektroforez ile boylarına göre ayrıştırılan DNA dizileri etidyum bromür gibi çift zincirli DNA boyaları ile boyanarak morötesi ışık altında görüntülenir.

3.2.1. Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu

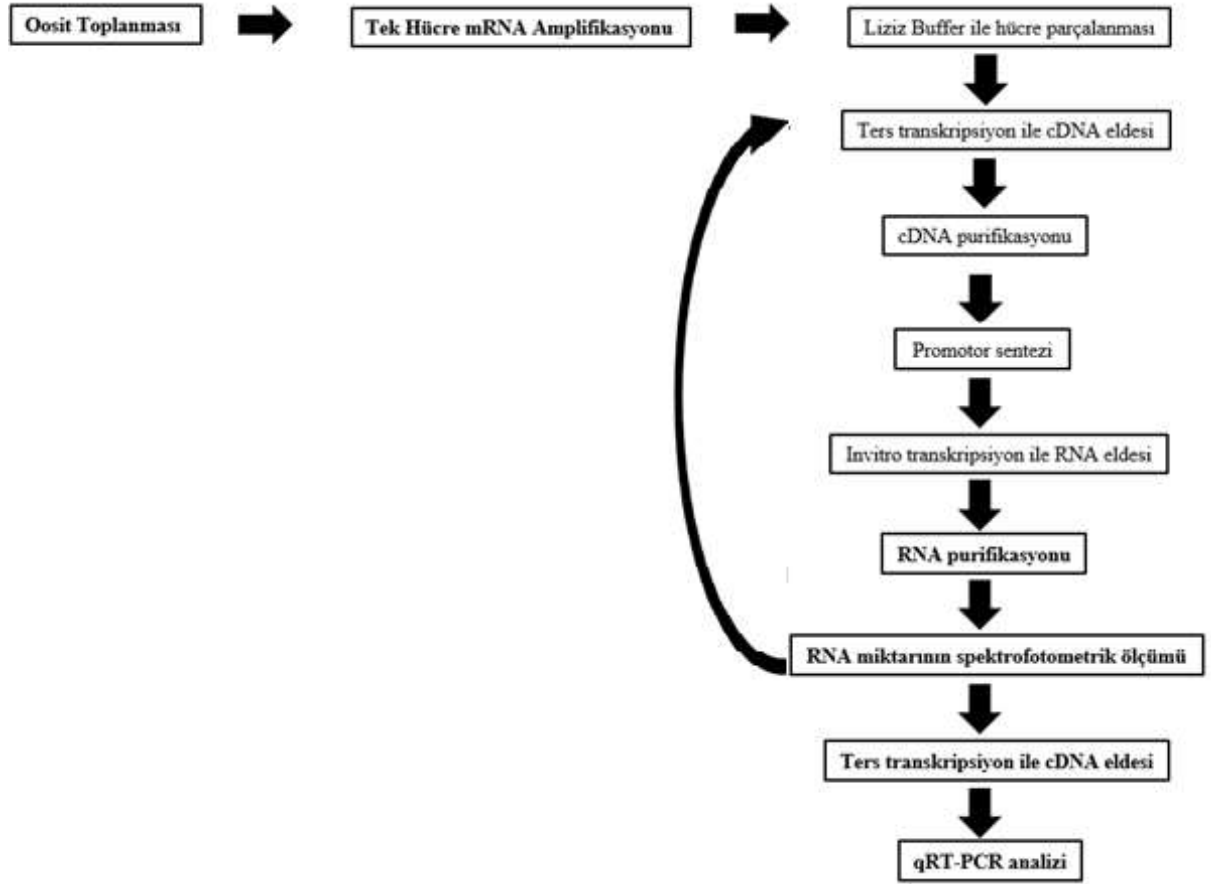
Nükleik asit amplifikasyonu ile eş zamanlı olarak artış gösteren floresan sinyalinin ölçülmesiyle, kantitatif sonuç alınabilen bir PCR yöntemidir. Sıcaklık döngüleri ve floresan okunması aynı cihaz içinde ve aynı tüp içinde gerçekleşmektedir. Böylece hedef bölge, elektroforeze gerek kalmadan kısa bir süre içinde saptanabilmektedir. [162].

qRT-PCR teknolojisi, gen düzeyinin ölçümünde rutin olarak kullanılan, uygulaması kolay, kesin sonuçlar veren ve hassasiyeti yüksek olan bir uygulamadır. RT-PCR, amplifikasyon sonuçlarına ulaşmak için harcanan zaman amplifikasyon ve analizle birlikte yapıldığı için daha kısadır. Diğer kantitatif metodlara oranla verim daha iyidir. Sistemin özellikleri tek bir reaksiyondan elde edilen bilgi miktarını en üst düzeye çıkarabilmek üzere geliştirilmiştir. Temel olarak amplifikasyonun ürünlerini

aynı zamanda sayısal değerlere dönüştürerek ölçmek ve devam eden PCR reaksiyonunu ekranda izleyerek reaksiyonun gidişini ölçmeye dayanmaktadır. Bu amaçla, floresans veren bazı boya ya da proplar ile oluşan floresansı saptayabilen ısıdöngü aygıtları kullanılır. Boyalar arasında en sık kullanılanı çift iplikli DNA'ya bağlanan SYBR Green I'dir. Reaksiyon sırasında hedef nükleik asit dizilerinin sayısı arttıkça, oluşan çift iplikli DNA moleküllerine giderek daha fazla sayıda SYBR Green I molekülü bağlanır ve daha fazla floresans oluşur. Oluşan floresans eş zamanlı olarak okunur. DNA'nın ayrılması sırasında bağlanmamış SYBR green düşük miktarda floresans verecektir [162-164].

3.2.2. Tek hücre kantitatif gerçek-zamanlı PCR

-80 °C'de dondurulan oositlerin her biri, hücre liziz solüsyonunda (lot: 9803S; Cell Signaling) çözüldü. Her bir oositin lizati SensationPlus™ FFPE Amplification and WT Labeling Kit (Affymetrix) kullanılarak, iki devre mRNA amplifikasyonları yapıldı. Amplifiye RNA, RNeasy Mini kit (lot: 74104; Qiagen) kullanılarak saflaştırıldı. RNA'nın miktarı, spektrofotometrik yöntemler ile (NanoDrop 1000, Thermo Scientific) ölçüldü. Her bir örnekten(2ug) amplifiye mRNA alınarak, ters transkripsiyonu yapıldı. cDNA'lar kalıp olarak kullanılarak TFAM, NEIL1, TDP1 ve PARP1, genlerinin ekspresyon profilleri qRT-PCR (SYBR Green Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR) ile gerçekleştirildi[164,165]. β -Aktin housekeeping geni kullanılarak, genç ve yaşlı fare oositlerde ekspresyonu belirlendi. Genç ve yaşlı fare oositlerinde, TFAM, NEIL1, TDP1 ve PARP1 genlerinin, β -Aktin'e göre, göreceli ekspresyonları belirlenirken $\Delta\Delta Ct$ yöntemi kullanıldı. Tüm gen primerleri Integrated DNA Technology'den elde edildi (bakınız çizelge 3.6).



Şekil 3.1. qRT-PCR yöntem tablosu

mRNA Amplifikasyonu

Her bir oositin lizatı SensationPlus™ FFPE Amplification and WT Labeling Kit (Affymetrix) kullanılarak, iki devre mRNA amplifikasyonları yapıldı.

Yöntem

cDNA Sentezi

1. Örnek üzerine toplam hacim 7ul olacak şekilde lizis tamponu eklendi.
2. Karışım üzerine 4 µl RT primer karışımı eklendi ve 11 µl karışım vortekslendi.
3. Elde edilen karışım 11 µl RNA-Primer karışımı 80°C'de 10 dakika ve 4°C'de 2 dakika boyunca termal döngü içerisinde inkübe edildi.
4. İnkübasyondan sonra örnekler vortekslendi.
5. Ayrı bir ependorfta amplifikasyon RT Master karışımı hazırlandı.

Çizelge 3.1. Amplifikasyon RT master karışımı

Kimyasal	Kullanılan hacim
RT Tampon Karışımı	4 µl
DTT	2 µl
dNTP	1 µl
RT Enzim	1 µl
RNase Inhibitör	1 µl
Toplam	9 µl

6. Karışım vortekslendi.
7. 11 µl RNA-Primer karışım içeren her bir örneğin üzerine 9 µl amplifikasyon RT master karışımı eklendi.
8. Elde edilen 20 µl karışım vortekslendi.
9. Elde edilen 20 µl karışım 42°C'de 60 dakika ve 25°C'de 2 dakika boyunca inkübe edildi.

cDNA Purifikasyonu

1. 80 µl nukleaz içermeyen su PCR tüpüne eklendi ve vortekslendi.
2. Elde edilen 100 µl'lik karışım ependorf tüpe aktarıldı.
3. Üzerine 300 µl DNA bağlanma tamponu eklendi.
4. Vortekslendi ve kısa santrifüj edildi.
5. Elde edilen 400 µl'lik karışım 2ml'lik yıkama tüpündeki koluma aktarıldı.
6. 10 000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
7. Tüpün altındaki süzüntü tekrar koluma aktarılarak 10 000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
8. Tüpün altında kalan süzüntü uzaklaştırıldı ve 150 µl DNA yıkama solüsyonu eklendi.
9. 10 000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
10. Tüpün altında kalan süzüntü uzaklaştırıldı ve 10 000 rpm'de, 2 dakika santrifüj edildi.
11. Elüsyon tüpüne kolum yerleştirildi ve 15 µl nukleaz içermeyen su eklendi.
12. 10 000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.

13. Tüpün altındaki üzüntü tekrar koluma yüklendi ve 10 000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi.

14. Elde edilen cDNA kullanıma hazır şekilde -20°C'de bekletildi.

Promotor Sentezi

1. 12 µl purifiye cDNA PCR tüpüne aktarıldı.
2. 80°C'de 10 dakika ve 4°C'de 2 dakika boyunca termal döngü içerisinde inkübe edildi.
3. Her bir örnek için Tailing master karışımı başka bir ependorfta hazırlandı.

Çizelge 3.2. Herbir örnek için hazırlanan tailing master karışımı

Kimyasal	Eklene miktar
Tailing Tampon Karışımı	6 µl
Tailing Enzim Karışımı	2 µl
Toplam	8 µl

4. Hazırlanan karışım vortekslendi.
5. 12 µl'lik her bir örneğe 8 µl Tailing Master karışımı dağıtıldı.
6. Elde edilen 20 µl'lik karışım Vortekslendi.
7. Elde edilen 20 µl'lik karışım 37C'de 2 dakika, 80 C'de 10 dakika ve 4 C'de 2 dakika boyunca termal döngü içerisinde inkübe edildi.
8. Ayrı bir ependorf tüpte promotor sentez master karışımı hazırlandı.

Çizelge 3.3. Her bir örnek için hazırlanan promotor sentez master karışımı

Kimyasal	Eklene miktar
Promotor Sentez Tampon Karışımı	4µl
Promotor Sentez Enzim Karışımı	1 ul
Toplam	5ul

9. Hazırlanan karışım vortekslendi.
10. 20 µl'lik her bir örneğe 5 µl promotor sentez karışımı dağıtıldı.
11. Elde edilen 25 µl'lik karışım vortekslendi.

12. Elde edilen 25 µl'lik reaksiyon karışımı 22°C'de 30 dakika boyunca termal döngü içerisinde inkübe edildi.

In vitro Trsankripsiyon

1. İn Vitro transkripsiyon için master karışımı hazırlandı.

Çizelge 3.4. Herbir örnek için hazırlanan İn Vitro transkripsiyon için master karışımı

Kimyasal	Kullanılan Miktar
T7 Nukleotid Karışımı	16 µL
T7 Tampon Karışımı	5 µL
T7 Enzim Karışımı	9 µL
Toplam	30 µL

2. Karışım vortekslendi.

3. 25µl'lik her bir promotor modifiyeli cDNA örnek üzerine, 30 µl in vitro transkripsiyon master karışımı eklendi.

4. 55µl'lik karışım vortekslendi.

5. Elde edilen 55µl'lik in vitro transkripsiyon reaksiyonu karışımı 37°C'de 16 saat boyunca ve ardından 4°C'de termal döngü içerisinde inkübe edildi.

RNA Purifikasyonu

Amplifiye RNA, RNeasy Mini kit (lot: 74104; Qiagen) kullanılarak saflaştırıldı.

Yöntem

1. Örnekler vortekslenerek üzerlerine toplam hacim 100 µl olacak şekilde RNase içermeyen su eklendi.
2. 100 µl'lik karışım 1,5ml'lik ependorf tüpe aktarıldı.
3. 350 µl RTL tamponu eklendi.
4. 250 µl %100 Etanol eklendi ve pipetle karıştırıldı.

5. 700 µl'lik karışımı qiagen mikro kolonlara aktararak 1dakika, 10 000 rpm'de santrifüj edildi.
6. Yıkama tüpünün altındaki süzüntü tekrar kolonlara döküldü ve 1dakika, 10 000 rpm'de santrifüj edildi.
7. Yıkama tüpündeki kalan süzüntü uzaklaştırıldı ve 700 µl RWI tamponu kolonlara eklendi ve 1dakika, 10 000 rpm'de santrifüj edildi.
8. Yıkama tüpündeki süzüntü uzaklaştırıldı.
9. Kolonlara 550 µl RPE tamponu eklendi ve 1dakika, 10 000 rpm'de santrifüj edildi.
10. Toplama tüpündeki süzüntü uzaklaştırıldı.
11. Kolonlara 500 µl, %80 Etanol eklenerek, 2 dakika, 10 000 rpm'de santrifüj edildi.
12. Kolonlar yeni toplama tüplerine yerleştirildi ve 5 dakika, 10 000 rpm'de santrifüj edildi.
13. Elüsyon tüplere kolonlar yerleştirildi ve 50 µl nükleaz içermeyen su eklendi ve 1dakika, 10 000 rpm'de santrifüj edildi.
14. Elüsyon tüpündeki süzüntü tekrar kolonlara döküldü ve 1dakika, 10 000 rpm'de santrifüj edildi.
15. Elde edilen RNA -80°C'de kullanılmak üzere bekletildi.

RNA Konsantrasyonunun Hesaplanması

RNA'nın miktarı, spektrofotometrik yöntemler ile (NanoDrop 1000, Thermo Scientific) ölçüldü.

RNA konsantrasyonu ve saflığı 260 ve 280 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüldü. RNA miktarlarının belirlenmesi için 260nm'deki absorpsiyon değeri, kontamine protein miktarının belirlenmesi için de 280nm'deki absorpsiyon değeri kullanıldı.

RNA'lardan Ters transkripsiyonla cDNA eldesi

Her bir örnekten(2 μ g) amplifiye mRNA alınarak, ters transkripsiyonu yapıldı.

Yöntem

1. Örnek üzerine toplam hacim 7 μ l olacak şekilde lizis tamponu eklendi.
2. Karışım üzerine 4 μ l RT primer karışımı eklendi ve 11 μ l RNA-Primer karışımı vortekslendi.
3. Elde edilen karışım 11 μ l RNA-Primer karışımı 80°C'de 10 dakika ve 4°C'de 2 dakika boyunca termal döngü içerisinde inkübe edildi.
4. İnkübasyondan sonra örnekler vortekslendi.
5. Ayrı bir ependorfta RT Master karışımı hazırlandı.

Çizelge 3.5. Herbir örnek için hazırlanan Ters transkripsiyon master karışımı

Kimyasal	Kullanılan hacim
RT Tampon	4 μ l
DTT	2 μ l
dNTP	1 μ l
RT Enzim	1 μ l
RNase Inhibitör	1 μ l
Toplam	9 μ l

6. Karışım vortekslendi.
7. 11 μ l RNA-Primer karışım içeren her bir örneğin üzerine 9 μ l RT master karışımı eklendi.
8. Elde edilen 20 μ l karışım vortekslendi ve 42°C'de 60 dakika ve 25°C'de 2 dakika boyunca inkübe edildi.

qRT-PCR Analizi

Elde edilen cDNA'lar kalıp olarak kullanılarak TFAM, NEIL1, TDP1 ve PARP1, genlerinin qRT-PCR (SYBR Green Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR) ile gerçekleştirildi [165,166]. β -Aktin housekeeping geni kullanılarak, genç ve yaşlı fare oositlerde ekspresyonu belirlendi.



Yöntem

1. 1 µl Primer, 5 µl SYBR Green ve 3 µl NFW olmak üzere her bir örnek başına toplam 9 µl reaksiyon karışımı hazırlanıp, kuyucuklara dağıtıldı.
2. Hazırlanan reaksiyon karışımı üzerine 2ul cDNA eklendi.
3. Uygun PCR programı ayarlanarak deney başlatıldı.

Çizelge 3.6. Hedef genlere ait primer dizileri

mTFAM	İleri 5'-GATGGCGCTGTTCCGG-3',	Geri 5'-TGGATAGCTACCCATGCTGGA-3'
mNEIL1	İleri 5'GTGGAGAGGAGGATTTGCT G-3'	Geri 5'-TGGATAGCTACCCATGCTGGA-3'
mTDP1	İleri 5'-GTAGTGACGAAAGCGAGGATG-3'	Geri 5'-CTGTCTCTTGTGTGCAACC TT-3'
mPARP1	İleri 5'-GGCAGCCTGATGTTGAGGT-3'	Geri 5'-GCGTACTCCGCTAAAAAGTC AC-3'

qRT-PCR verilerinin karşılaştırmalı CT yöntemiyle analizi

RT-PCR'da eşik döngüsü (CT) deneysel olarak florasan sinyalinin üçüncü ve onbeşinci döngüsü ile on standart sapma arasında ölçülen florasan sinyallerinin ortalamasına ulaştığı döngü olarak tanımlanır. Karşılaştırmalı CT yöntemi $2^{-\Delta\Delta C_T}$ olarak tanımlanır ve hedef genin göreceli miktarı ile referans gen karşılaştırılır. Genlerin ekspresyon seviyeleri her bir örnek için β -aktin ile standardize edilerek $2^{-\Delta\Delta C_T}$ matematiksel modeline göre hesaplanmıştır [166].

Hesaplama

1. Tüm gen replikasyonları için CT değeri hesaplandı.
2. Hedef gen ve beta aktin arasındaki ΔC_t değeri, $\Delta C_t = C_t (\text{Hedef Gen}) - C_t (\text{Referans gen})$ matematiksel formül kullanılarak hesaplandı.
3. Replikonlar arasındaki ortalama C_t değeri hesaplandı.
4. Delta Delta C_t değer, $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t (\text{hedef gen}) - \Delta C_t (\text{kontrol})$ matematiksel formül kullanılarak hesaplandı.
5. Daha sonra katsayı değerleri $2^{-\Delta\Delta C_T}$ hesaplandı.

	Ct (β -Actin)	Ct (GEN)	Δ Ct (y-x) Δ Ct (b-a)	Ortalama		$\Delta\Delta$ Ct	Fold change ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)
Genç1	x	y	z	ort1	ORT Genç	ORT Genç - ORT Genç = 0	1
	x	y	z				
	x	y	z				
Genç2	x	y	z	ort2			
	x	y	z				
	x	y	z				
Genç3	x	y	z	ort3			
	x	y	z				
	x	y	z				
Genç4	x	y	z	ort4			
	x	y	z				
	x	y	z				
Genç5	x	y	z	ort5			
	x	y	z				
	x	y	z				
Yaşlı1	a	b	c	ort1	ORT Yaşlı	ORT Yaşlı - ORT Genç = t	F
	a	b	c				
	a	b	c				
Yaşlı2	a	b	c	ort2			
	a	b	c				
	a	b	c				
Yaşlı3	a	b	c	ort3			
	a	b	c				
	a	b	c				
Yaşlı4	a	b	c	ort4			
	a	b	c				
	a	b	c				
Yaşlı5	a	b	c	ort5			
	a	b	c				
	a	b	c				

Şekil 3.2. RT-PCR verilerinin karşılaştırmalı CT yöntemiyle analizi

3.3. İmmünofloresan Tekniği

%4'lük paraformaldehitte (USB, Lot: 126101, Cleveland, OH, USA) fikse edilen genç ve yaşlı oositler 12 saat sonra, fosfat tampon solüsyonu'na (PBS) aktarılarak yıkandı, daha sonra permeabilizasyon için %0.1'lik Triton solüsyonunda, oda sıcaklığında, 10 dakika bekletildikten sonra tekrar yıkanarak %1'lik normal goat serum'da (Invitrogen, Lot: 998215A, Frederick, MD, USA) oda ısısında 30 dakika bekletildi. PBS ile yıkama aşamalarının ardından, genç ve yaşlı fare oositleri, mouse anti-PARP-1 (Abcam, ab194586, lot: GR240201-1; MA; USA) ve mouse anti-TDP1 (Abcam, ab4166, lot: GR82389-1; MA, USA) antikolarıyla +4°C'de gece boyu inkübe edildi. PBS ile yıkama aşamalarının ardından 37°C'de, 1 saat boyunca goat anti-rabbit (Lot: 1705912, Life Technologies, Eugene, OR, USA) sekonder antikoruna etkin bırakıldı. PBS ile yıkama aşamalarından sonra, nükleer boyanma için propidium iodide (PHOENIX, Lot: UAD0205M1) solüsyonunda, oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi. Boyanan oositler Zeiss LSM 710 konfokal mikroskop altında değerlendirildi.

3.4. İstatistiksel Analiz

Tüm veriler ortalama \pm standart hata olarak gösterildi. Veriler Student t test istatistik programıyla yapıldı. $P < 0,05$ değerindeki anlamlılık düzeyi istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

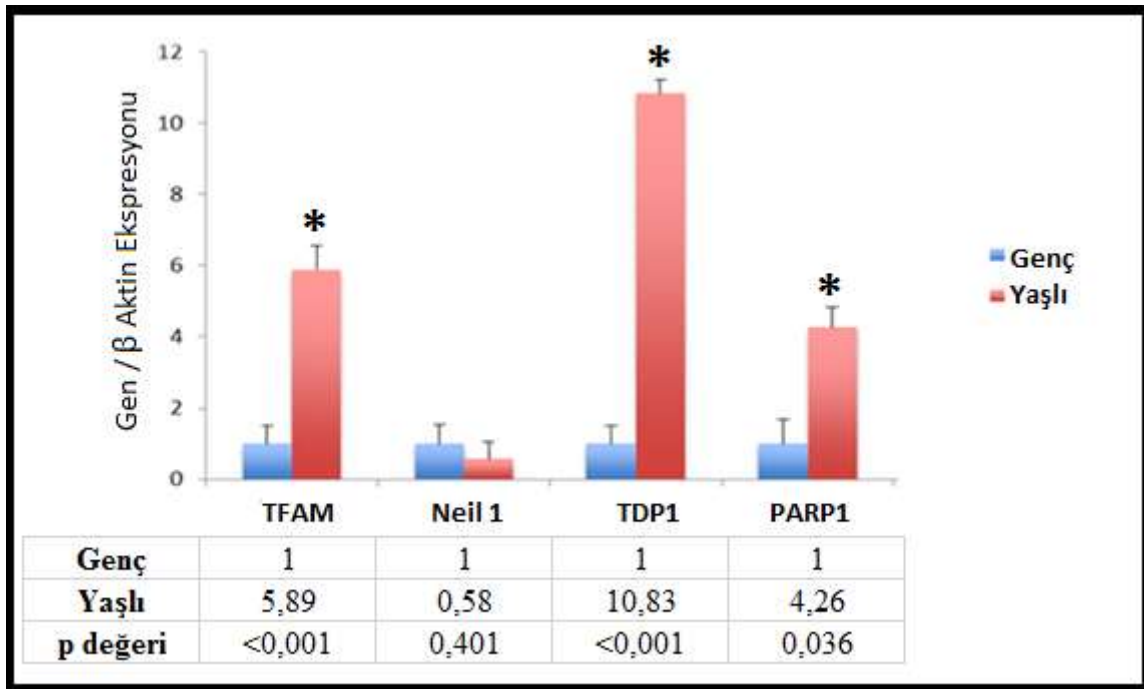




4. BULGULAR

4.1. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Yaşın oosit mitokondriyonu üzerine etkisini araştırmak amacıyla, mtDNA tamir yollarında yer alan genlerin ekspresyonları farelerden elde edilen her bir oositte qRT-PCR yöntemi ile incelendi bulgular şekil (Şekil 4.1) tablo ve grafik halinde sunuldu.



Şekil 4.1. Oositlerde yaşın DNA hasar ve tamir genlerinin ifadelenmesi üzerine etkisi (*: yaşlı ve genç gruplar arasındaki fark anlamlı)

Genç ve yaşlı fare oositlerindeki gen ekspresyon seviyelerinin β -aktin seviyesine farkları alınarak kat değişim değerleri hesaplandı. Kat değişim değerleri ortalama \pm standart hata olarak gösterildi. Kat değişim değerleri TFAM için, genç oositlerde $1 \pm 0,51$; iken yaşlı oositlerde $5,886026347 \pm 0,65$; NEİL1 için genç oositlerde $1 \pm 0,54$; yaşlı oositlerde $0,5792483 \pm 0,48$; TDP1 için genç oositlerde $1 \pm 0,51$ iken yaşlı oositlerde $10,82946 \pm 0,40$; ve PARP1 genç oositlerde $1 \pm 0,69$ iken, yaşlı oositlerde $4,259443 \pm 0,57$ olarak saptandı ve gruplara göre veriler şematize edildi (Şekil 4.1).

Genç ve yaşlı oositlerde TFAM ekspresyonları değerlendirildiğine genç gruba göre yaşlı grupta istatistiksel olarak anlamlı artış izlendi ($p<0,001$); NEIL1 ekspresyonları değerlendirildiğinde genç gruba göre yaşlı grupta azalma izlendi, ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,401$). TDP1 ekspresyonları değerlendirildiğinde genç gruba göre yaşlı grupta istatistiksel olarak anlamlı artış izlendi ($p<0,001$); PARP1 ekspresyonları değerlendirildiğinde de genç gruba göre yaşlı grupta istatistiksel olarak anlamlı artış dikkati çekti ($p=0,036$).

mtDNA paketleme proteini olan ve oksidatif hasarlı mtDNA'ya hasarsız mtDNA'ya oranla daha fazla bağlanan TFAM gen ekspresyonu, yaşlı fare oositlerinde genç fare oositlerine oranla anlamlı derecede artmıştı. Bu bulgu, yaşla birlikte ROS birikiminden dolayı, mtDNA hasarının arttığına göstergesi olarak kabul edildi. NEIL1, mtDNA'nın kullandığı başlıca tamir yolağı BER'de yer alan, hasarlı bazlar üzerinde etkili, çift fonksiyonlu bir glikozilazdır. NEIL1 gen ekspresyonu, yaşlı fare oositlerinde genç farelere oranla azalmıştır. mtDNA'nın TFAM tarafından paketlenmesi, mtDNA tamir mekanizmasının hasarlı kısma ulaşmasını sınırlandırmakta dolayısıyla, tamir oranını azaltmaktadır. Yaşlı oositlerde, TFAM'in yüksek ve NEIL1'in düşük ifadenemesinin, yaşla birlikte oksidatif DNA hasarının birikmesi nedeniyle yaşla ilişkili DNA tamirinde azalmayla sonuçlanabileceği kanısına varıldı.

mtDNA'nın kullandığı tamir yolaklarından DNA tek zincir kırık tespitinde yer alan PARP1 ve tamirinde yer alan TDP1 genlerinin ekspresyonları yaşlı fare oositlerinde genç farelere kıyasla, anlamlı derecede yüksek bulundu. Bu bulgular da oositlerde yaşla birlikte DNA tek zincir kırıklarının arttığına ve bu kırıklardan kaynaklı hasara dengeleyici bir tamir yanıtı oluştuğunun göstergesi olarak kabul edildi.

4.2. İmmünofloresan Boyama

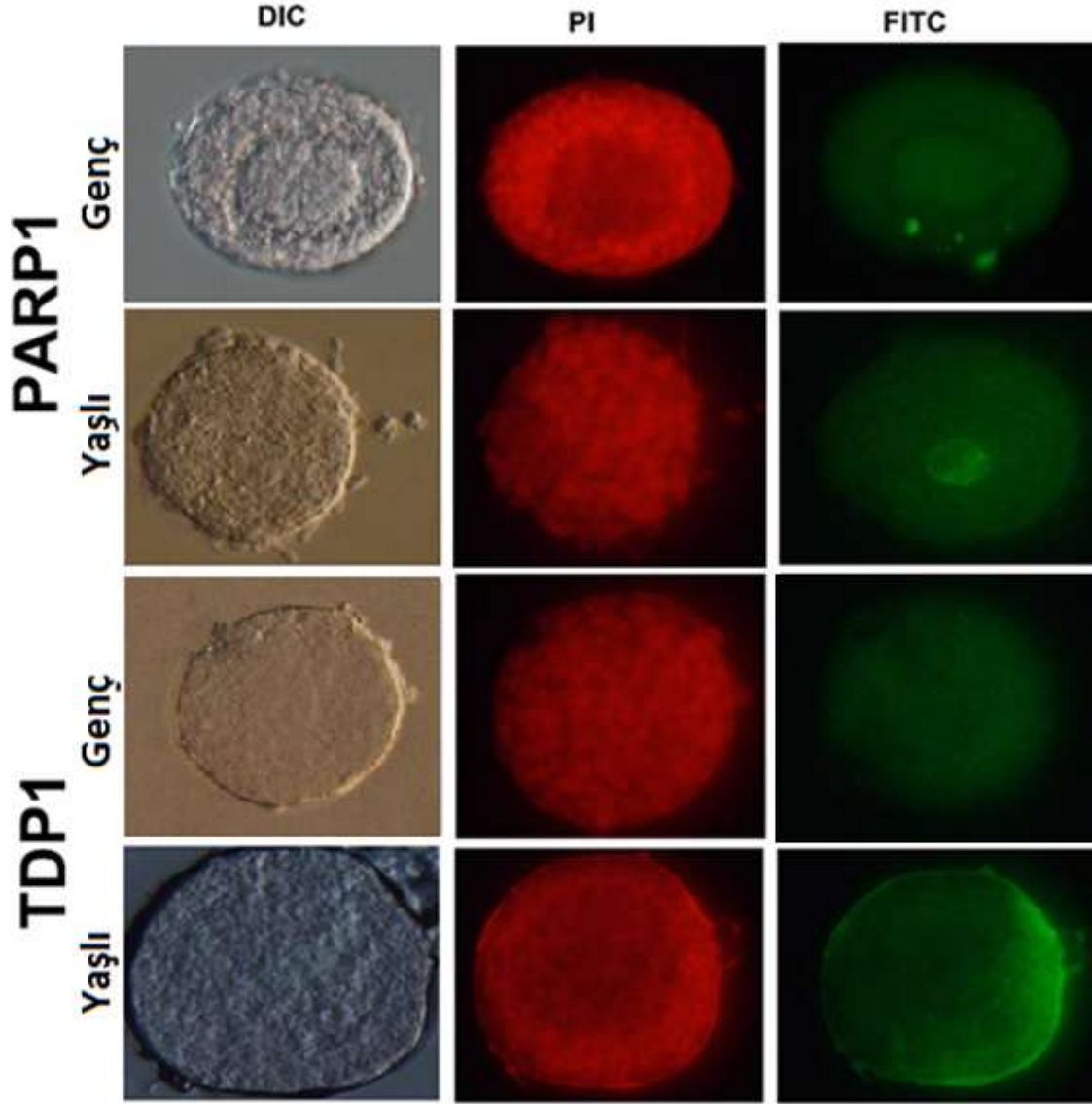
DNA tek zincir kırık tespit ve tamirinde görev alan genlerin ekspresyonlarını belirledikten sonra literatürde bu iki gene ait protein ekspresyonlarına dair çalışmaların yetersiz olması nedeniyle ve qRT-PCR bulgularının protein yansımalarını gözlemlemek amacıyla , genç ve yaşlı fare oositlerinde, PARP1 ve

TDP1 protein ekspresyonları, immunofloresan yöntemi kullanılarak analiz edildi (Resim 4.1).Bu çalışma teropatik gen tedavisi hedeflenerek planladığı için, immünofloresan uygulamalar dejenere olmaları nedeniyle özellikle GV oositler tercih edilerek yapıldı.Yaşlı fare oositlerinde, genç farelere kıyasla, PARP1 ve TDP1 protein ifadelenmesinde paralel artış gözlemlendi.

GV oositlerde mitokondriyonlar enerji gereksinimine göre perinükleer ve perifer sitoplazmada yerleşim gösterirler. İncelediğimiz iki proteinin ekspresyonu da literatüre lokalizasyonlarda ayırd edildi.

Yaşa bağlı PARP1 ekspresyonu değerlendirildiğinde; DNA tek zincir kırıklarında sensör olarak görev yapan bu gene ait proteinin, genç GV oositlerde perinükleer ve sitoplazmanın periferinde zayıf floresan işaretlenmesi izlenirken, yaşlı oositlerde floresan yansımanın yine perinükleer alanda ancak çok daha kuvvetli olduğu gözlemlendi. Yaşlı oosit sitoplazmasında PARP1 ekspresyonu genç gruptan ayrıcalı olarak, belirli bir alanda lokalize izlenirken, bu bulgu mitokondriyonların bazı yaşlı GV oositlerde kümeler oluşturabileceğini gösterdi.

DNA tek zincir kırık tamirinde görev yapan TDP1 genine ait protein ekspresyonu diğer genden ayrıcalı olarak, periferel sitoplazmada floresan işaretleme gösterdiği belirlendi. Bu bulgu incelenen oositlerdeki enerji gereksinimin sonucu olarak değerlendirildi. TDP1 immünofloresan boyamasının yaşlı oositlerde genç oositlere kıyasla, çok daha kuvvetli olduğu saptandı. İmmünofloresan bulguları qRT-PCR bulgularıyla uyumluluk gösterdi.



Resim 4.1. Genç ve yaşlı fare oositleri anti-PARP-1 (FITC, yeşil) ve anti-TDP1 (FITC, yeşil) primer antikorlarla işaretlenmesi ve konfokal mikroskoptaki görüntüsü (X40), Differential interference contrast (DIC), Kırmızı: Çekirdek, Yeşil: Fluorescein isothiocyanate (FITC).

5. TARTIŞMA

Oositlerde enerji ihtiyacı, mitokondriyonlarda gerçekleşen oksidatif fosforilasyonla sağlanır [167]. Mitokondriyonlar hücrenin hayatta kalmasında, steroid biyosentezinde, termogenezde ve apoptozda önemli rol alır [168]. Mitokondriyonlarda gerçekleşen ETS, ROS'un en önemli kaynağıdır. ROS'lar dışı üreme sisteminde önemli rol oynamakla birlikte, oositler ROS'lara aşırı derecede duyarlıdır [169]. ROS'ların fizyolojik seviyesi yararlı olsa da, yüksek seviyedeki ROS oosit maturasyonu ve embriyo gelişimine zarara verir.[170]. Oosit maturasyonu, düzgün fertilizasyon ve embriyo gelişimi için çok önemlidir. Maturasyon sırasında oosit gelişir ve hücrenel ve moleküler seviyede yeniden yaplanır. Bu yeniden şekillenmede, ATP' ye gereksinimi vardır ve ancak yeterli miktarda ATP ile düzgün ve tam bir sitoplazmik ve nükleer olgunlaşma gerçekleşir [171].

Memelilerin çoğunda, MII oositlerde mitokondriyonlar genellikle MII iğ ipliklerinin etrafına yakın yerde bulunurlar [172-173]. Bu lokalizasyon mitokondriyonların iğ ipliği oluşumunda ve iğ ipliği bütünlüğünün sürdürülmesinde önemli olduğunun göstergesidir. İleri yaştaki kadın oositlerinde sıklıkla anormal iğ ipliği oluşumları, anormal kromozom dizilimleri ve sonuçta da yüksek oranda anöploidi gözlenir [22]. Bu anormalliklerin yeterli miktarda ATP sağlanamamasından kaynaklandığı düşünülmektedir [174].

mtDNA, halkasal, ikili sarmal yapıda ve 37 gen kodlar. Toplam uzunluğu yaklaşık 16 600 nükleotid uzunlukta olan bu genomdan her organelde onlarca kopya bulunur [175]. mtDNA koruyucu histonlarla çevrilmemiştir ancak mtDNA bağlanma proteini TFAM mtDNA'yı tam anlamıyla örtecek miktarda bulunur ve genomun kondensasyonunu sağlar [176]. TFAM, mtDNA replikasyonunda, transkripsiyonunda ve nükleotidlerin yapısal organizasyonunda görevlidir [177].

Mitokondriyonlarda sürekli ROS ürettildiğinden, matrikte yer alan mtDNA kimyasal hasara yatkındır. Bu durum, gen ifadenmesi ve ETS aktivitesini doğrudan etkiler [165]. DNA tamiri ve yaşlanma hızında yer alan pek çok gen söz konusudur. Yaşlanma ile ilişkili oksidatif strese en kritik hedeflerden biri de DNA'dır. Bir

tarafından DNA bazıları ROS tarafından modifiye edilirken, diğer taraftan DNA tamir enzimleri bu lezyonları tamir etmeye çalışırlar [167]. mtDNA mitokondriyon iç membranının iç kısmında, ROS'ların üretildiği yerde bulunmasından dolayı, oksidatif hasara etkin kalır. Mitokondriyonların oksidatif hasarlı bazıları kaldırmak için endojen DNA onarım mekanizmaları vardır. mtDNA onarım mekanizmasının başlıca ve en iyi karakterize edilmiş olanı, BER'dir [178].

BER, oksidasyon, deaminasyon ve alkalizasyonun neden olduğu DNA modifikasyonlarının tamirinde yer alır. BER hem nukleusta hemde mitokondriyonlarda gerçekleşir, mekanizmaları benzerdir ancak mitokondriyonların kendilerine ait bağımsız bir BER yolağı vardır . Mitokondriyonlarda gerçekleşen BER'de yer alan bütün enzimler, nukleusta kodlanır ve mitokondriyonlara gönderilir [93]. BER yolağı 3 basamakta gerçekleşir, modifiye bazın tanınması ve çıkarılması, meydana gelen AP kısmının işlenmesi, doğru nükleotidlerin eklenmesi ve zincir ligasyonu [179].

Hamatani ve arkadaşları, mtDNA'da kodlanan ve mitokondriyal elektron taşıma zincirinde yer alan genlerden mt-Nd3, mt-Atp6 ve mt-Co1-3'ün, yaşlı oositlerde çok fazla eksprese edildiğini saptamışlardır. Tam tersi olarak, nükleer genomda kodlanan fakat enerji yolağı ve mitokondriyon fonksiyonunda görevli olan genlerin de genç oositlerde eksprese edildiğini gözlemlemişlerdir. Araştırmacılar, genlerin ekspresyonlarındaki bu değişimlerin yaşlı oositlerde ATP üretimindeki azalmaya bağlı olduğu kanısına varmışlardır [180].

Daha önce yapılan bir çalışmada BER'de yer alan proteinlerin mitokondriyon iç zarında, TFAM ile birlikte yerleşim gösterdiği saptanmıştır [181] Canugovi ve ark.; BER'de yer alan proteinler ile TFAM'in birlikte lokalize olmaları ve hasarlı DNA'yı ortak hedef olarak tercih etmeleri nedeniyle çalışmalarında TFAM'in BER'deki ve mtDNA hasarındaki rolünü HeLa hücrelerinde araştırmışlardır. Çalışmanın sonucunda, TFAM'in, hasarsız ve tercihen hasarlı mtDNA'ya bağlandığını ve BER yolağında yer alan, glikozilaz, AP-endonükleaz ve DNA polimeraz basamaklarının aktivitesini düşürdüğünü saptamışlardır [182].

Bizim çalışmamızda da yaşın oosit mtDNA hasarı üzerine etkisini belirlemek amacıyla, mtDNA paketleme proteini olan TFAM'ın, gen ekspresyonu genç ve yaşlı farelerden elde edilen her bir oositte qRT-PCR yöntemiyle incelendi. Sonuçta; TFAM gen ekspresyonunun yaşlı fare oositlerinde, genç fare oositlerine kıyasla anlamlı derecede artmış olduğu izlendi (Bkz. Şekil 4.1). Bu bulgu, yaşla birlikte mitokondriyonlarda üretilen ROS birikiminden kaynaklı, mtDNA hasarının arttığına göstergesi olarak kabul edildi.

BER yolağının ilk basamağında, hasarlı bazın tanınması ve çıkarılmasında DNA glikozilazlar yer alır. Memeli mitokondriyonlarında bilinen 4 tane çift fonksiyonlu glikozilaz vardır bunlar: 8-oxoguanine DNA glikozilaz-1 (OGG1), *E. coli* endonuclease III homologu NTH1, Nei-like DNA glikozilaz 1 ve 2 (NEIL1 ve NEIL2) glikozilazlardır [98,102].

NEIL1 ekspresyonunun değerlendirildiği literatür bilgileri kısıtlı olmakla birlikte, yapılan bir çalışmada, farelerde beyin korteks ve hipokampus bölgelerine ait mitokondriyonlarda yaşa bağlı mtBER basamakları, bu basamakları katalizleyen DNA glikozilazlardan; OGG1, UNG1, NHT1, NEIL1 ve APE enzimlerinin aktiviteleri değerlendirilmiştir. Çalışmanın sonucunda, DNA glikozilaz aktivitelerinin, hipokampus mitokondriyonlarında, kortikal mitokondriyonlara göre daha düşük olduğu saptanmış, kortikal mitokondriyonlarda DNA glikozilaz aktivitelerinin orta-yaşta en üst noktaya çıktığı, ileri yaşlarda ise anlamlı derecede düştüğü izlenmiştir [183].

Biz de çalışmamızda genç ve yaşlı fare oositlerinde, NEIL1 gen ekspresyonunu qRT-PCR yöntemi ile inceledik. Gredilla ve arkadaşlarının bulgularına koşut, bizim çalışmamızda da, NEIL1 gen ekspresyonu yaşlı fare oositlerinde, genç fare oositlerine kıyasla azalma gösterdiği saptandı (Bkz. Şekil 4.1).

BER yolağı ile ilgili bulgularımız, literatür desteği ile değerlendirildiğinde yaşla birlikte artan hasarlı mtDNA'ya, TFAM'ın yüksek affiniteyle bağlanması sonucunda, mtDNA tamir mekanizmasında yer alan enzimlerin hasarlı alana ulaşmasını sınırlandığı, bu durumun da TFAM'ın mtDNA tamir oranını düşürmüş olabileceği kanısına varıldı. Yaşlı oositlerde, TFAM'ın yüksek ve NEIL1'in düşük

ifadelenmesinin ise yaşla birlikte artan oksidatif DNA hasarının birikmesinden dolayı, ilerleyen yaşta DNA tamirinde azalma olabileceğini düşündürdü.

DNA tek zincir kırık tamiri, ROS tarafından indüklenen DNA hasarına yanıt olarak gerçekleşir [27,184]. Tek zincir DNA kırık tamiri, BER'in alt yolağı olarak, 3' ve 5' DNA uçlarının düzenlenmesinde yer alır [185]. Tek zincir DNA kırık tamir basamaklarında, BER'de yer alan basamaklardan ilk ikisi olan; hasarlı bazın uzaklaştırılması ve abazik kısmın düzenlenmesi yer almaz [27].

PARP1 DNA tek zincir kırıklarının tamirinde yer alan ve nükleer DNA'da kodlanan sensör bir gendir. mtDNA'da lokalize olduğu ve mtDNA'nın tamirinde yer aldığı düşünülür [121]. PARP1'in tek zincir kırıklarının tanımasının ardından, DNA tamir enzimlerinin DNA'nın hasarlı bölgesine bağlanmaları sağlayarak reaksiyon kaskadını başlatır [186-187].

Bizim çalışmamızda da PARP1 gen ekspresyonu, yapılan tek hücre qRT-PCR analizinde, yaşlı fare oositlerinde genç fare oositlerine kıyasla artmış olarak izlendi. Bu bulgu 122 ve 124 in bulgularına koşut, yaşla birlikte olasılıkla artan DNA tek zincir kırıklarında PARP1 'in sensör olarak görev yaptığının kanıtı olarak kabul edildi.

TDP1 DNA 3' ucundaki fosfodiester bağınyı hidrolize eden ve 3'-fosfoglikolate, 3'-abazik kısımlar, 3'-nükleozidaz aktivitesi olmak üzere, genel olarak DNA'nın 3'-uçlarının işlenmesinde yer alan bir tamir enzimidir. TDP1 mitokondriyonda belirlenmiş olan, 3'-DNA uçlarının düzenlenmesinde yer alan, tek enzimidir[124]. Tek zincir DNA kırık tamirinde TDP1, sensör gen olan PARP1 ile etkileşim halindedir [188].

Yapılan bir çalışmada, oldukça yaygın kullanılan antikanser ve antiviral bir ilaç olan zincir-sonlandırıcı nükleozid analogları (CNTA)'nın indüklediği nükleer ve mitokondriyal DNA hasarında TDP1'in rolü; TDP1'den yoksun ve normal farelerden elde edilen DT40 hücrelerinde araştırılmıştır. Çalışmada, asiklovir (ACV), cytarabine (Ara-C), zidovudine (AZT) ve zalcitabine (ddC) olmak üzere dört adet CNT analogu kullanılmıştır. Çalışmada DT40 hücreler, ACV ve Ara-C etkin

birakıldıklarında nükleer DNA hasarı, AZT ve ddC etkin bırakıldıklarında da mitokondriyon hasarı meydana getirmişlerdir.

Çalışmanın sonucunda araştırmacılar; nDNA'da; TDP1'in, DNA'nın 3'OH ucuna kovalent bağlı CNTA'ları uzaklaştırabildiğini göstermişlerdir. Hücreler CTN analoglarından ACV ve Ara-C'ye etkin bırakıldıklarında, TDP1'den yoksun hücrelerin DNA hasarına daha duyarlı olduğu ve daha fazla DNA hasarı biriktirdiklerini saptamışlardır. Bunun sonucunda da TDP1'in CTNA ile indüklenmiş DNA hasar tamirinde yer aldığı kanısına varılmıştır.

Çalışmanın devamında; AZT ve ddC ile indüklenen mitokondriyon fonksiyon bozukluğunda, TDP1'in mtDNA tamirindeki rolü araştırılmıştır. AZT ve ddC ile etkin kalmanın, TDP1'den yoksun hücrelerde mtDNA'da yoğun hasara neden olduğu saptanmıştır. Bu bulgular ışığında araştırmacılar, CTN analoglarıyla indüklenen nükleer ve mitokondriyal DNA hasar tamirinde TDP1'in önemli rol aldığını vurgulamışlardır [189].

Bizim çalışmamızda Sharyin ve arkadaşlarının araştırmalarından farklı olarak genç ve yaşlı fare oositlerinde DNA tek zincir kırıklarının tamirinde görev alan TDP1'in gen ekspresyonu, qRT-PCR yöntemiyle araştırıldı. Deneyler sonucunda, TDP1 gen ekspresyonunun yaşlı fare oositlerinde, genç fare oositlerine oranla anlamlı derecede yüksek olduğu izlendi (Bkz. Şekil 4.1).

PARP1 ve TDP1 gen ekspresyon bulguları bir arada değerlendirildiğinde, oositlerde yaşla birlikte DNA tek zincir kırıklarının arttığı, bununla bağlantılı sensör gen olan PARP1 ve bir tamir geni olan TDP1'in orantılı olarak artıp, bu kırıklara karşı dengeleyici bir tamir yanıtı oluşturduğu sonucuna varıldı.

Fam ve ark. 2013 yılında yaptıkları çalışmalarında çeşitli insan dokularında TDP1 protein ekspresyonunu immunohistokimyasal, immunofloresan ve qRT-PCR teknikleriyle incelemişlerdir. Çalışmada 39 haftalık erkek fetüs, 6 haftalık kız yeni doğan ve 16 yaşında kadından elde edilen dokularda yaptıkları immunohistokimyasal boyamalar sonucunda TDP1'in adrenal kortikal ve medullar hücrelerde, özofagusta, midede, böbreklerde, dalakta beyaz pulpada, primer oositi

çevreleyen foliküler hücrelerde, akciğerde tip II pinositlerde sitoplazmik ve nükleer ekspresyon, pinosit I 'de, ovaryumlarda primer oosit sitoplazmasında, iskelet kası hücrelerinde sadece sitoplazmik ekspresyon gösterdiğini belirtmişlerdir. İnsan iskelet kası dokusunda yapılan TDP1 işaretlemelerinde tutulumun sitoplazmik olması ve daha önce meme kanserli hücrelerde [190] TDP1'in sitoplazmik tutulumunun gösterilmesinin ardından araştırmacılar TDP'in mitokondriyonlarda yerleşik olabileceğini düşünmüş ve insan iskelet kası hücrelerinde TDP'in ve sitokrom c ile immünreaktivitesini immunofloresan yöntemle göstermişlerdir.

Aynı araştırmacılar, sitoplazmik TDP1 ekspresyonunu kültüre edilmiş insan dermal fibroblast hücrelerinde, oksidatif stres uygulanması sonrasında değerlendirmişler ve sonuçta oksidatif streste sitoplazmik TDP1 ekspresyonun arttığını dolayısıyla özellikle mitokondriyonlarda lokalize olduğunu belirlemişlerdir. Araştırmacılar son olarak qRT-PCR yöntemi kullanarak TDP1 ekspresyonunun oksidatif streste arttığını onaylamışlar. Çalışmanın sonucunda, kültüre insan dermal fibroblast hücrelerinde TDP1'in mitokondriyonda işaretlendiği ve oksidatif stresle birlikte artan mtDNA hasar tamirinde sitoplazmik TDP1'in rolü olduğu vurgulanmıştır [191].

TDP1'in protein düzeyindeki ekspresyonu ve hücresel lokalizasyonunun yanında Marianna ve arkadaşları, sensör gen olan PARP1'in protein düzeyindeki ekspresyonu ve hücre lokalizasyonunu 2009 yılında yayınladıkları çalışmalarında göstermişlerdir. Araştırmacılar insan FB 1329 fibroblast hücreleri ve HeLa hücrelerinde PARP1 protein ekspresyonunu ve lokalizasyonunu, sırasıyla Western blot analizi ve lazer konfokal mikroskop ile incelemişlerdir. Çalışmanın sonucunda PARP1 protein ekspresyonu izole mitokondriyonlarda Western blot yöntemi ile gözlenmiştir. Bu çalışma PARP1'in miokondriyal lokalizasyonunun ilk olarak gösterilmesi nedeniyle de öncüdür. Araştırmacılar bir mitokondriyal protein olan mitofilin ve PARP1 ile yaptıkları ikili boyamalarda mitofilin ile birlikte boyanma gösteren PARP1'in mitokondriyonlarda lokalize olduğunu göstermişlerdir. Araştırmacılar PARP1'in mtDNA hasar sinyalinde veya tamirinde rol alabileceğini vurgulamışlardır [192].

Bizim çalışmamızda da, literatüre uygun olarak, gen ekspresyon çalışmalarımızı desteklemek ve PARP1 ve TDP1 protein ekspresyon ve lokalizasyonlarını gözlemlemek amacıyla, genç ve yaşlı fare oositlerinde, immünofloresan tekniğiyle boyamalar yapılmış ve konfokal mikroskop ile değerlendirilmiştir. Sonuç olarak yaşlı fare oositlerinde, genç fare oositlerine kıyasla, PARP1 ve TDP1 protein ifadenmesinde paralel artış gözlenmiştir (Bkz. Resim 4.1). PARP1'in özellikle perinükleer alanda, TDP1'in ise perifer sitoplazmada ekspresyonlarının yaşlı oositlerde, genç oositlere kıyasla, daha kuvvetli olduğu izlenmiştir (Bkz. Resim 4.1).





6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Oositlerde yaşlanmayla bağlantılı mtDNA tamir mekanizmalarındaki değişikliklerin moleküler genetik teknikler ve immunofloresan yöntemleri ile incelemeyi amaçladığımız çalışmamızda mitokondriyal DNA tamir yollarından BER ve DNA tek zincir kırıklarının tamirinde etkin çeşitli genler araştırıldı.

BER yolağında yer alan ve oksidatif DNA hasarında artan TFAM'ın yaşla birlikte ekspresyonunun arttığı, bu yolda bir tamir geni olan NEIL1 ekspresyonunun ise azaldığı qRT-PCR yöntemi ile belirlendi. Bu bulgu ışığında histona sahip olmayan mtDNA'larda koruyucu olarak davranan TFAM'ın yaşla birlikte mtDNA'da yoğun ekspresyon olarak, tamir geni olan NEIL1'in hasarlı alana ulaşmasını sınırladığı, bu nedenlerle yaşlı farelerde NEIL1 ekspresyonunun azalmış olabileceği düşünüldü.

DNA tek zincir kırıklarının tespitinde rol alan PARP1 ve tamirinde işlevsel gen olan TDP1 gen ekspresyonlarının qRT-PCR analizinde yaşla birlikte bu iki genin ifadenmesinin arttığı saptanmış olup, bu bulgular protein düzeyinde immunofloresan yöntemlerle de desteklenmiştir. İmmunofloresan bulgular bu iki genin mtDNA'da lokalize olduğunu da doğrulamıştır.

Bulgularımız, fare oositlerinde, yaşla birlikte oksidatif mitokondriyal DNA hasarı ve tek zincir DNA kırıklarının birikimi arasında kuvvetli ilişkili olduğunu göstermektedir. Çalışmamızın sonuçları, yaşla birlikte oosit mitokondriyal fonksiyonlarının değiştiğini desteklemektedir. Bu değişikliklerin, oosit mitokondriyal fonksiyonlarının etkileyip etkilemediğini belirlemek amacıyla konu ile ilgili ileri araştırmaların yapılması gerekmektedir.



KAYNAKLAR

1. Qian, L., Geng, X., Zheng, W., Tang, J., XU, Bo. and Shi, Q. (2012). Current understanding of ovarian aging. *Science China*, (55), 659-669.
2. Block, E. (1952). Quantitative morphological investigations of the follicular system in women; variations at different ages. *Acta Anatomica*, (14), 108–123.
3. Block, E. (1953). A quantitative morphological investigation of the follicular system in newborn female infants. *Acta Anatomica*, (17), 201–206.
4. Baker, T.G. (1963). A quantitative and cytological study of germ cells in human ovaries. *Proceedings of the Royal Society Biological Sciences*, (158), 417–433.
5. Broekmans, F., Knauff, A. and te Velde, E. (2007). Female reproductive ageing: Current knowledge and future trends. *Trends in Endocrinology-Metabolism*, (18), 58-65.
6. Hansen, K., Knowlton, N. and Thyer, A. (2008). A new model of reproductive aging: The decline in ovarian non-growing follicle number from birth to menopause. *Human Reproduction*, (23), 699-708.
7. McGee, E. and Hsueh, A.J. (2000). Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocrine Reviews*, (21), 200–214.
8. Hirshfield, A.N. (1991). Development of follicles in the mammalian ovary. *International Review of Cytology*, (124), 43–101.
9. Markstrom, E., Svensson E. and Shao, R. (2002). Survival factors regulating ovarian apoptosis-dependence on follicle differentiation. *Human Reproduction*, (123), 23–30.
10. Velde, E.R., and Pearson, P.L. (2002). The variability of female reproductive ageing. *Human Reproduction*, (8), 141–154.
11. Alviggi, C., Humaidan, P. and Howles, CM. (2009). Biological versus chronological ovarian age: Implications for assisted reproductive technology. *Reproductive Biology and Endocrinology*, (7), 101.
12. Faddy, M., Gosden, R.G. and Gougeon, A. (1992). Accelerated disappearance of ovarian follicles in mid-life: Implications for forecasting menopause. *Human Reproduction*, (7), 1342–1346.
13. Schwartz, D. and Mayaux, M.J. (1982). Female fecundity as a function of age: results of artificial insemination in 2193 nulliparous women with azoospermic husbands. *The New England Journal of Medicine*, (306), 404–406.

14. Van Noord-Zaadstra, B.M., Looman, C.W., Alsbach, H., Habbema, J.D., te Velde, E.R. and Karbaat, J. (1991). Delaying childbearing: effect of age on fecundity and outcome of pregnancy. *British Medical Journal*, (302), 1361–1365.
15. Treloar, A.E., Boynton, R.E., Behn, B.G. and Brown, B.W. (1967). Variation of the human menstrual cycle through reproductive life. *International Journal of Fertility & Sterility*, (12), 77–126.
16. Soules, M.R., Sherman, S., Parrott, E., Rebar, R., Santoro, N., Utian, W. and Woods, N. (2001). Executive summary: Stages of Reproductive Aging Workshop (STRAW). *Fertil Steril*, (76), 874–878.
17. Den Tonkelaar, I., te Velde, E.R. and Looman, C.W. (1998). Menstrual cycle length preceding menopause in relation to age at menopause. *Maturitas*, (29), 115–123.
18. Vollman, R.F. (1977). The menstrual cycle. *Major Problems in Obstetrics and Gynecology*, (7), 1–193.
19. Te Velde, E.R., Scheffer, G.J. and Dorland, M. (1998). Developmental and endocrine aspects of normal ovarian aging. *Molecular and Cellular Endocrinology*, (145), 67–73.
20. Klein, N.A. and Soules, M.R. (1998). Endocrine changes of the perimenopause. *Clinical Obstetrics and Gynecology*, (41), 912–920.
21. Navot, D., Bergh, P.A. and Williams, M.A. (1991). Poor oocyte quality rather than implantation failure as a cause of age-related decline in female fertility. *Lancet*, (337), 1375–1377.
22. Battaglia, D.E., Goodwin, P., Klein, N.A. and Soules, M.R. (1996). Influence of maternal age on meiotic spindle assembly in oocytes from naturally cycling women. *Human Reproduction*, (11), 2217–2222.
23. Pellestor, F., Anahory, T. and Hamamah, S. (2005). Effect of maternal age on the frequency of cytogenetic abnormalities in human oocytes. *Cytogenetic and Genome Research*, (111), 206–212.
24. Younis, J.S. (2011). Ovarian aging: Latest thoughts on assessment and management. *Current Opinion in Obstetrics & Gynecology*, (23), 427–434.
25. Wang, Q., Ratchford, A.M., Chi, M.M., Schoeller, E., Frolova, A. and Schedl, T. (2009). Maternal diabetes causes mitochondrial dysfunction and meiotic defects in murine oocytes. *Molecular Endocrinology*, 23(10), 1603–12.
26. Copeland, W.C. (2012). Defects in mitochondrial DNA replication and human disease. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, (47), 64–74.
27. Caldecott, K.W. (2008). Single-strand break repair and genetic disease. (2008). *Nature Reviews Genetics*, (9), 619–631.

28. Spikings, E.C., Alderson, J. and John, J.C.S. (2010). Regulated mitochondrial DNA replication during oocyte maturation is essential for successful porcine embryonic development. *Biology of Reproduction*, 83(1),1-3.
29. Falkenberg, M., Larsson, N.G. and Gustafsson, C.M. (2007). DNA replication and transcription in mammalian mitochondria. *Annual Review of Biochemistry*, (76), 679-99.
30. Cam, H., Balciunaite, E., Blais, A., Spektor, A., Scarpulla, R.C. and Young (2004). A common set of gene regulatory networks links metabolism and growth inhibition. *Molecular Cell*, 16(3),399-411.
31. Klein, H.L., The consequences of Rad51 overexpression for normal and tumor cells (2008). *DNA Repair*, 7, 686–693.
32. Jansen, RP. and Boer, K. (1998). The bottleneck: mitochondrial imperatives in oogenesis and ovarian follicular fate. *Molecular and Cellular Endocrinology*,(145), 81-88.
33. Vera, Y., Diaz-Romero, M., Rodrigues, S., Lue, Y., Wang, C., Swerdloff, RS. and Hikim, APS. (2004). Mitochondria dependent pathway is involved in Heat-induced male germ cells death: lessons from mutant mice. *Biological Reproduction*, (70), 1534–1540.
34. Cooke, M.S., Evans, M.D., Dizdaroglu, M. and Lunec, J. (2003). Oxidative DNA damage: Mechanisms, mutation, and disease. *Federation of American Societies for Experimental Biology*, (17), 1195-1214.
35. Evans, M.D. and Cooke, M.S. (2004). Factors contributing to the outcome of oxidative damage to nucleic acids. *Bioessays*, (26), 533-542.
36. Miquel, J., Economos, C., Fleming, J. and Johnson, J.E. (1980). Mitochondrial role in cell ageing. *Experimental Gerontology*, (15), 575-591.
37. Titus, S., Li, F., Stobezki, R., Akula, K., Unsal, E., Jeong, K., Dickler, M., Robson, M., Moy, F., Goswami, S. and Kutluk, O. (2013). Impairment of BRCA1-Related DNA Double-Strand Break Repair Leads to Ovarian Aging in Mice and Humans. *Science Translational Medicine*, (5),172ra21.
38. Sadler, TW. (2011). *Langman's Medical Embryology*, (7.Edition). Baltimore, Williams & Wilkins,1995.
39. Moore, K.L. and Persaud, T.V.N. (2002). *İnsan Embriyolojisi*, (6.Baskı). İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 225-55.
40. Gartner, L.P. and Hiatt, L.J. (2001). *Color Text Book of Histology*, (2. Edition). London: WB Saunders, 463-82.
41. Ross, M.H. (2003). *Histology a Text and Atlas of Histology*, (4. Edition). Philedelphia: Williams and Wilkins, 773-88.

42. Kierszenbaum, A.L. (2006). *Histoloji ve Hücre Biyolojisi* (Türkçe çeviri). Ankara: Palme Yayıncılık, 565-85.
43. Gürsoy, E. ve Ergin, K. (2007). *Dişi Üreme Sistemi Atlası*. Ankara: Nobel Tıp Kitabevleri.
44. Arıncı, K. ve Elhan, A. (2006). *Anatomi*, (4. Baskı). İstanbul: Güneş Kitabevi, 196-225.
45. Bükülmez, O. ve Arıcı, A. (1996). *Over fizyolojisi Temel Kadın Hastalıkları ve Doğum Bilgisi*. Ankara: Güneş Kitabevi, 1129-1145.
46. Mayes M. (2002). The meiotic arrest of bovine oocytes. Département des sciences animales Faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation Université Laval Québec PhD thés. De l'Université Laval, Québec Canada, 4-110.
47. Kubelka, M., Motlik, J., Fulka, J.J., Prochazka, R., Rimkevıkova, Z. and Fulka, J. (1988). Time sequence of germinal vesicle breakdown in pig oocytes after cycloheximide and p-aminobenzamidine block. *Gam. Res.* (19), 423-431.
48. Jamnongjit, M. and Hammes, S.R. (2005). Oocyte Maturation: The Coming Of Age Of A Germ Cell. *Semin Reprod Med.* Aug; 23(3), 234-41.
49. Alberts, B. and Bray, D. (1994). *Molecular Biology of The Cell*. 3rd Ed. Garland Science, NY. U.S.A.
50. Cooper, G.M. and Hausman, R.E. (2007). *The Cell, A Molecular Approach*, 4. Ed. ASM Pres, Washington, USA. 603-641.
51. Conti, M. (2002). Specificity of the Cyclic Adenosine 3',5'-Monophosphate Signal in Granulosa Cell Function. *Biology of Reproduction*, (67), 1653–1661.
52. Salavati, M., Ghafari, F., Zhang, T. and Ali, A. (2012). Effects of oxygen concentration on in vitro maturation of canine oocytes in a chemically defined serum-free medium, *Society for Reproduction and Fertility*, 1741–7899.
53. Druzhyna, N.M., Wilson, G.L. and LeDoux, S.P. (2008). Mitochondrial DNA repair in aging and disease. *Mechanisms of Ageing and Development*, 129, 383-390.
54. Chinnery, P.F. and Schon, EA. (2003). Mitochondria. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, (74), 1188-1199.
55. Wallace, D.C. (2005). A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annual Review of Genetics*, 39,3 59-407.
56. Zapico, S. and Ubelaker ,H. (2013). mtDNA Mutations and Their Role in Aging, Diseases and Forensic Sciences *Aging and Disease*, 4(6), 364-380.

57. Fridovich, I. (1995). Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annual review of Biochemistry*, (64), 97-112.
58. Martin, L.J. (2012). Biology of mitochondria in neurodegenerative diseases. *Progress in molecular biology and translational science*, (107), 355-415.
59. Dai, D.F. and Rabinovitch, PS. (2009). Cardiac aging in mice and humans: the role of mitochondrial oxidative stress. *Trends in Cardiovascular Medicine*, (19), 213-220.
60. Ott, M., Gogvadze, V., Orrenius, S. and Zhivotovsky, B. (2007). Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis: An International Journal on Programmed Cell Death*, (12), 913-922.
61. D'Autreaux, B. and Toledano, M.B. (2007). ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, (8), 813-824
62. Fogg, V.C., Lanning, N.J. and Mackeigan, J.P. (2011). Mitochondria in cancer: at the crossroads of life and death. *Chinese Journal of Cancer*, (30), 526-539.
63. Sohal, R.S. and Weindruch, R. (1996). Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science*, (273), 59-63.
64. Thompson, L.V. (2006). Oxidative stress, mitochondria and mtDNA-mutator mice. *Experimental Gerontology*, (41), 1220-1222.
65. Burçak, G. ve Andican, G. (2004). Oksidatif DNA hasarı ve yaşlanma, *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*, (35), 159-169.
66. Wallace, D.C. (1997). Mitochondrial DNA in aging and disease. *Scientific American*, 277(2), 40-47.
67. Beal, F. (2004). Aging, energy, and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Annals of Neurology*, (38), 357-366.
68. Kasamatsu, H., Vinograd, J. and Annu, H. (1974). Replication of Circular DNA in Eukaryotic Cells *Review of Biochem*, (43), 695-719.
69. Wang, Z.G., White, P.S. and Ackerman, S.H. (2001). Atp11p and Atp12p are assembly factors for the F (1)-ATPase in human mitochondria. *Journal Of Biological Chemistry*, (276), 30773-8.
70. Singh, K.K. and Kulawiec, M. (2009). Mitochondrial DNA polymorphism and risk of cancer. *Methods Molecular Biology*, (471), 291-303
71. Gilkerson, R.W. (2009). Mitochondrial DNA nucleoids determine mitochondrial genetics and dysfunction. *The international journal of biochemistry & cell biology*, (41), 189.

72. Kukat, C., and Larsson, N.G. (2013). mtDNA makes a U-turn for the mitochondrial nucleoid. *Trends in Biochemical Sciences*, 23(9), 457-63.
73. Charles, F., Norman, K. and Kenneth, J. (1984). An Analysis of the Dynamics of Mammalian Mitochondrial DNA Sequence Evolution. *National Institute of Environmental Health Sciences*, 1(5), 423-434.
74. William, J., Ballard, O. and Michael, C. (2004). The incomplete natural history of mitochondria. *Molecular Ecology*, (13), 729–744.
75. Bogenhagen, D.F.(2012). Mitochondrial DNA nucleoid structure. *Biochim Biophys Acta*, (1819), 914-1920.
76. Larsson, N.G., Wurm, C.A., Falkenberg, M., Kukat, C., Spahr, H. and Jakobs, S. (2011). Super-resolution microscopy reveals that mammalian mitochondrial nucleoids have a uniform size and frequently contain a single copy of mtDNA *National Academy of Sciences*, (108), 13534-13539.
77. DiMauro, S. and Davidzon, G. (2005). Mitochondrial DNA and disease. *Annals of Medicine*, (37), 222–232.
78. Andrews, R.M., Kubacka, I. and Chinnery, P.F. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nature Genetics*, (23),147.
79. Bestwick, M.L. and Shadel, G.S. (2013). Accessorizing the human mitochondrial transcription machinery. *Trends in Biochemical Sciences*, 38(6), 283-91
80. Graziewicz, M.A., Longley, M.J., Bienstock, R.J., Zeviani, M. and Copeland, W.C. (2004). Structure-function defects of human mitochondrial DNA polymerase in autosomal dominant progressive external ophthalmoplegia. *Nature Structural and Molecular Biology*, 11(8), 770-6.
81. Taylor, R.W. and Turnbull, D.M. (2005). Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nature Reviews Genetics*, 6(5),389-402.
82. Taanman, J.W. (1999). The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1410(2),103-23.
83. Perlman, S., Abelson, T. and Penman, S. (1973). Mitochondrial Protein Synthesis: RNA with the Properties of Eukaryotic Messenger RNA, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 70(2), 350-353.
84. Rydberg, B. and Lindahl, T. (1982). Nonenzymatic methylation of DNA by the intracellular methyl group donor S-adenosyl- L-methionine is a potentially mutagenic reaction. *EMBO Journal*, (1), 211–216.
85. De Bont, R. and van Larebeke, N. (2004). Endogenous DNA damage in humans: A review of quantitative data. *Mutagenesis*, (19), 169-185.

86. Horne, D.W., Holloway, R. and Wagner, C. (1997). Transport of Sadenosylmethionine in isolated rat liver mitochondria. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, (343), 201–206.
87. Xiao, W. and Samson, L. (1993). In vivo evidence for endogenous DNA alkylation damage as a source of spontaneous mutation in eukaryotic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, (90), 2117– 2121.
88. Lindahl, T. (1993). Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*, (362), 709–715.
89. Kamiya, H. (2003). Mutagenic potentials of damaged nucleic acids produced by reactive oxygen/nitrogen species: Approaches using synthetic oligonucleotides and nucleotides: Survey and summary. *Nucleic Acids Research*, (31), 517–531.
90. El-Khamisy, S.F. and Caldecott, K.W. (2007). DNA single-strand break repair and spinocerebellar ataxia with axonal neuropathy-1. *Neuroscience*, (145), 1260–1266.
91. Kasperek, T.R. and Humphrey, T.C. (2011). DNA double-strand break repair pathways, chromosomal rearrangements and cancer. *Semin Cell Development Biology*, (22), 886–897.
92. Slupphaug, G., Kavli, B. and Krokan, H.E. (2003). The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. *Mutation Research*, 531(1-2), 231-251.
93. Bohr, A. (2002). Repair of oxidative DNA damage in nuclear and mitochondrial DNA, and some changes with aging in mammalian cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 32(9), 804–812.
94. Svilar, D., Goellner, E.M., Almeida, K.H. and Sobol, RW. (2011). Base excision repair and lesion-dependent subpathways for repair of oxidative DNA damage. *Antioxidan Redox Signal*, (14), 2491–2507.
95. Slupphaug, G. (1993). Nuclear and mitochondrial forms of human uracil-DNA glycosylase are encoded by the same gene. *Nucleic Acids Research*, (21), 2579–2584.
96. Nilsen, H. (1997). Nuclear and mitochondrial uracil-DNA glycosylases are generated by alternative splicing and transcription from different positions in the UNG gene. *Nucleic Acids Research*, (25), 750–755.
97. Nakabeppu, Y. (2001). Regulation of intracellular localization of human MTH1, OGG1, and MYH proteins for repair of oxidative DNA damage. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, (68), 75–94.
98. Zhang, Y. (2008). Mitochondrial topoisomerase I sites in the regulatory D-loop Region of mitochondrial DNA, *Biochemistry*, (47), 11196-11203.

99. Takao, M., Aburatani, H. and Kobayashi, K., and Yasui, A. (1998). Mitochondrial targeting of human DNA glycosylases for repair of oxidative DNA damage. *Nucleic Acids Research*, (26), 2917–2922.
100. Chattopadhyay, R., Wiederhold, L., Szczesny, B., Boldogh, I., Hazra, T., Izumi, T. and Mitra S. (2006). Identification and characterization of mitochondrial abasic (AP)-endonuclease in mammalian cells. *Nucleic Acids Research*, (34), 2067–2076.
101. Demple, B. and Harrison, L. (1994). Repair of oxidative damage to DNA: enzymology and biology. *Annual Review of Biochemistry*, (63), 915–948.
102. Dodson, M.L. and Lloyd, R.S. (2002). Mechanistic comparisons among base excision repair glycosylases. *Free Radical Biology Medical*, (32), 678–682.
103. Ikeda, S., Kohmoto, T., Tabata, R. And Seki, Y. (2002). Differential intracellular localization of the human and mouse endonuclease III homologs and analysis of the sorting signals. *DNA Repair*, (1), 847–854.
104. Longley, M.J., Prasad, R., Srivastava, D.K., Wilson, S.H. and Copeland, W.C. (1998). Identification of 50-deoxyribose phosphate lyase activity in human DNA polymerase gamma and its role in mitochondrial base excision repair in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, (95), 12244–12248.
105. Mandal, S.M., Hegde, M.L., Chatterjee, A., Hegde, P.M., Szczesny, B., Banerjee, D., Boldogh, I., Gao, R., Falkenberg, M. and Gustafsson, C.M. (2012). Role of human DNA glycosylase Nei-like 2 (NEIL2) and single strand break repair protein polynucleotide kinase 30-phosphatase in maintenance of mitochondrial genome. *Journal of Biological Chemistry*, (287), 2819–2829.
106. Xu, G., Herzig, M., Rotrekl, V. and Walter, C.A. (2008). Base excision repair, aging and health span. *Mechanisms of Ageing and Development*, 129(7-8), 366–382.
107. Tann, A.W. *et al.* (2011). Apoptosis induced by persistent single-strand breaks in mitochondrial genome: critical role of EXOG (5'-EXO/endonuclease) in their repair. *J. Biol. Chem.* 286, 31975–31983. Provocatively, this paper suggests that EXOG, rather than FEN1 and DNA2, mediates LP-BER in mitochondria.
108. Lakshminpathy, U. and Campbell, C. (2000). Mitochondrial DNA ligase III function is independent of Xrcc1. *Nucleic Acids Res.* (28), 3880–3886.
109. Kalifa, L., Beutner, G., Phadnis, N., Sheu, S.S. and Sia, E.A. (2009). Evidence for a role of FEN1 in maintaining mitochondrial DNA integrity. *DNA Repair*, 8(10), 1242–1249.
110. Alexeyev, M., Shokolenko, I., Wilson, G. and LeDoux, S. (2015). The Maintenance of Mitochondrial DNA Integrity-Critical Analysis and Update, *Cold Spring Harb Perspect Biol* (5), a012641.

111. Zheng, L., Zhou, M. and Guo, Z. (2008). Human DNA2 is a mitochondrial nuclease/helicase for efficient processing of DNA replication and repair intermediates. *Molecular Cell*, 32(3),325–336.
112. Achanta, G. (2005). Novel role of p53 in maintaining mitochondrial genetic stability through interaction with DNA Pol γ . *European Molecular Biology*, (24), 3482–3492.
113. De Souza-Pinto, N.C., Harris, C.C. and Bohr, V.A. (2004). p53 functions in the incorporation step in DNA base excision repair in mouse liver mitochondria. *Oncogene*, (23), 6559–6568 .
114. Chen, D., Yu, Z., Zhu, Z. and Lopez, C.D. (2006). The p53 pathway promotes efficient mitochondrial DNA base excision repair in colorectal cancer cells. *Cancer Research*, (66), 3485–3494.
115. De, S. (2012). RECQL4 is essential for the transport of p53 to mitochondria in normal human cells in the absence of exogenous stress. *Journal of Cell Science*, (125), 2509–2522.
116. Huang, J.C., Zamble, D.B., Reardon, J.T., Lippard, S.J. and Sancar, A. (1994). HMG-domain proteins specifically inhibit the repair of the major DNA adduct of the anticancer drug cisplatin by human excision nuclease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, (91), 10394–10398.
117. Lee, Y., Katyal, S., Li, Y., El-Khamisy, S.F., Russell, H.R., Caldecott, K.W. and McKinnon, P.J. (2009). The genesis of cerebellar interneurons and the prevention of neural DNA damage require XRCC1. *Nat Neurosci.* (12), 973–980.
118. Mortusewicz, O., Fouquerel, E., Ame, J.C., Leonhardt, H. and Schreiber, V. (2011). PARG is recruited to DNA damage sites through poly(ADP-ribose)- and PCNA-dependent mechanisms. *Nucleic Acids Res.* (39), 5045–5056.
119. Niere, M., Kernstock, S., Koch-Nolte, F. and Ziegler, M. (2008). Functional localization of two poly(ADP-ribose)-degrading enzymes to the mitochondrial matrix. *Mol Cell Biol.* (28), 814–824.
120. Whatcott, C.J., Meyer-Ficca, M.L., Meyer, R.G., Jacobson, M.K. (2009). A specific isoform of poly(ADP-ribose) glycohydrolase is targeted to the mitochondrial matrix by a N-terminal mitochondrial targeting sequence. *Exp Cell Res.* 315), (3477–3485).
121. Reeves, R. and Adair, J.E. (2005). Role of high mobility group (HMG) chromatin proteins in DNA repair. *DNA Repair*, (4), 926–938.
122. Lakshmiathy, U. and Campbell, C. (1999). The human DNA ligase III gene encodes nuclear and mitochondrial proteins, *Molecular and Cellular Biology*, (19), 3869-3876..
123. Ahel, I. (2006). The neurodegenerative disease protein aprataxin resolves abortive DNA ligation intermediates. *Nature*, (443), 713–716.

124. Sykora, P., Wilson, D.M. and Bohr, V.A. (2012). Repair of persistent strand breaks in the mitochondrial genome. *Mechanisms of Ageing and Development*, (133), 169–175.
125. Das, B.B., Dexheimer, T.S., Maddali, K. and Pommier, Y. (2010). Role of tyrosyl-DNA phosphodiesterase (TDP1) in mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, (107), 19790–19795.
126. Liu, P., Qian, L., Sung, J.S., de Souza-Pinto, N.C., Zheng, L., Bogenhagen, D.F., Bohr, V.A., Wilson, D.M., Shen, B. and Demple, B. (2008). Removal of oxidative DNA damage via FEN1-dependent long-patch base excision repair in human cell mitochondria. *Mol Cell Biol*. (28), 4975–4987.
127. Duxin, J.P., Dao, B., Martinsson, P., Rajala, N., Guittat, L., Campbell, J.L., Spelbrink, J.N. and Stewart, S.A. (2009). Human DNA2 is a nuclear and mitochondrial DNA maintenance protein. *Mol Cell Biol*. (29), 4274–4282.
128. Tann, A.W., Boldogh, I., Meiss, G., Qian, W., Van, H.B., Mitra, S. and Szczesny, B. (2011). Apoptosis induced by persistent single-strand breaks in the mitochondrial genome: critical role of EXOG (5' exo/endonuclease) in their repair. *J Biol Chem*.
129. Lakshmiathy, U. and Campbell, C. (2000). Mitochondrial DNA ligase III function is independent of Xrcc1. *Nucleic Acids Res.*, (28), 3880–3886.
130. Sykora, P., Croteau, D.L., Bohr, V.A. and Wilson, D.M. (2011). Aprataxin localizes to mitochondria and preserves mitochondrial function. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, (108), 7437–7442.
131. Stracker, T.H. and Petrini, J.H.J. (2011). The MRE11 complex: starting from the ends. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, (12), 90–103.
132. Lieber, M.R. (2010). The Mechanism of Double-Strand DNA Break Repair by the Nonhomologous DNA End-Joining Pathway. *Annual Review of Biochemistry*, 79(1), 1-1.31.
133. Dmitrieva, N.I. , Malide, D. and Burg, M.B. (2011). Mre11 is expressed in mammalian mitochondria where it binds to mitochondrial DNA. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, (301), 632-640.
134. Papeta, N. (2010). Prkdc participates in mitochondrial genome maintenance and prevents Adriamycin-induced nephropathy in mice. *Journal of Clinical Investigation*, (120), 4055-4064.
135. Symington, L. S. and Gautier, J. (2011). Double-strand break end resection and repair pathway choice. *Annual Review of Genetics*, (45), 247–271.
136. Bolderson, E., Tomimatsu, N., Richard, D. J., Boucher, D., Kumar, R., Pandita, T. K., Burma, S. and Khanna, K.K. (2010). Phosphorylation of Exo1 modulates homologous recombination repair of DNA double-strand breaks. *Nucleic Acids Research*, 38(6), 1821-1831.

137. Sage, J.M., Gildemeister, O.S. and Knight, K.L. (2011). Discovery of a novel function for human Rad51: maintenance of the mitochondrial genome. *Journal Biol. Chem*, (285), 18984-18990.
138. Mortensen, U.H., Lisby, M. and Rothstein, R. (2009). Rad52. *Current Biology*, 19(16), 676-677.
139. Mazin, A.V., Mazina, O.M., Bugreev, D.V. and Rossi, M.J. (2010). Rad54, the motor of homologous recombination. *DNA Repair*, 9(3), 286-302.
140. Liu, Y., Tarsounas, M., O'Regan, P. and West, S.C. (2007). Role of RAD51C and XRCC3 in Genetic Recombination and DNA Repair. *Journal of Biological Chemistry*, 282(3), 1973-1979.
141. Duxin, J.P. (2009). Human Dna2 is a nuclear and mitochondrial DNA maintenance protein. *Molecular Cellular Biology*, (29), 4274–4282.
142. Kleff, S., Kemper, B. and Sternglanz, R. (1992). Identification and characterization of yeast mutants and the gene for a cruciform cutting endonuclease. *European Molecular Biology*, (11), 699–704.
143. Minczuk, M. (2011). TEFM is necessary for transcription of human mtDNA. *Nucleic Acids Research*, (39), 4284–4299.
144. Bailey, L.J. (2009). Mice expressing an error-prone DNA polymerase in mitochondria display elevated replication pausing and chromosomal breakage at fragile sites of mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Research*, (37), 2327–2335.
145. Sathananthan, A.H. and Trounson, A.O. (2000). Mitochondrial morphology during preimplantational human embryogenesis. *Human Reproduction*, (15), 148–159.
146. Chen, X., Prosser, R., Simonetti, S., Sadlock, J., Jagiello, G. and Schon, E.A. Rearranged mitochondrial genomes are present in human oocytes.(1995). *American Journal of Human Genetics*, (57), 239–247.
147. Marteil, G. , Richard, L. , and Kubiak, J.Z. (2009). Role of oocyte quality in meiotic maturation and embryonic development. *Reproductive Biology*, 9(3), 203-4.
148. Sathananthan, A.H. (2000). *Ultrastructure of human gametes, fertilization and embryo development*. In Handbook of In Vitro Fertilization 2nd edn. A.O. Trounson and D.K. Gardner, eds. CRC Press, Florida, 43 –465.

149. Sun, Q.Y. and Schatten, H. (2006). Regulation of dynamic events by microfilaments during oocyte maturation and fertilization. *Reproduction*, 131(2), 193-205.
150. Blerkom, V. (2004). Mitochondria in human oogenesis and preimplantation embryogenesis: engines of metabolism, ionic regulation and developmental competence. *Reproduction*, 128(3), 269-80.
151. Van-Blerkom, J., Davis, P. and Alexander, S. (2000). Differential mitochondrial distribution in human pronuclear embryos leads to disproportionate inheritance between blastomeres: relationship to microtubular organization, ATP content and competence. *Human Reproduction*, (15), 2621–2633.
152. May-Panloup, P., Chretien, M.F., Savagner, F., Vasseur, C., Jean, M., Malthiery, Y. and Reynier, P. (2003). Increased sperm mitochondrial DNA content in male infertility. *Human Reproduction*, (18), 550–556.
153. Soleimani, R. Heytens, E. Darzynkiewicz, Z. ve Oktay, K. (2011). Mechanisms of chemotherapy-induced human ovarian aging: double strand DNA breaks and microvascular compromise. *Aging*, (3), 782.
154. Motta, P.M., Nottola, S.A., Makabe, S. and Heyn, R. (2000). Mitochondrial morphology in human fetal and adult female germ cells. *Hum Reproduction*, (15), 129-147.
155. Saretzki, G., Walter, T., Atkinson, S., Passos, J.F., Bareth, B., Keith, W.N., Stewart, R., Hoare, S., Stojkovic, M. and Armstrong, L. (2008). Downregulation of multiple stress defense mechanisms during differentiation of human embryonic stem cells. *Stem Cells*, (26), 455–464.
156. Luoma, P., Melberg, A., Rinne, J.O., Kaukonen, J.A., Nupponen, N., Chalmers, R.M., Oldfors, A., Rautakorpi, I., Peltonen, L. and Majamaa, K. (2004). Parkinsonism, premature menopause, and mitochondrial DNA polymerase gamma mutations: clinical and molecular genetic study. *Lancet*, (364), 875–882.
157. Houghton, F.D. (2006). Energy metabolism of the inner cell mass and trophectoderm of the mouse blastocyst. *Differentiation*, (74), 11–18.
158. Wilding, M., Dal, B., Marino, M., Matteo, L., Alviggi, C., Pisaturo, M.L., Lombardi, L. and De Placido, G. (2001). Mitochondrial aggregation patterns and activity in human oocytes and preimplantation embryos. *Human Reproduction*, (16), 909–917.
159. Muller-Hocker, J., Schafer, S., Weis, S., Munscher, C. and Strowitzki, T. (1996). Morphological-cytochemical and molecular genetic analyses of mitochondria in isolated human oocytes in the reproductive age. *Molecular Human Reproduction*, (2), 951–958.

160. Keefe, D.L., Niven-Fairchild, T., Powell, S. and Buradagunta, S. (1995). Mitochondrial deoxyribonucleic acid deletions in oocytes and reproductive aging in women. *Fertil Steril*, (64), 577–583.
161. Hardy, K., Hooper, M.A., Handyside, A.H., Rutherford, A.J., Winston, R.M. and Leese, H.J. (1989). Non-invasive measurement of glucose and pyruvate uptake by individual human oocytes and preimplantation embryos. *Human Reproduction*, (4), 188–191.
162. Alp, A., Pınar, A., Eser, Ö., Sarıbaş, Z. ve Ergünay, K. (2012). *Hacettepe PCR kurs kitapçığı*.
163. Turhan, H. (2008). *Mide kanserli hastalarda periferik kanda telomeraz mRNA ekspresyonunun real time PCR kullanılarak belirlenmesi ve klinikopatolojik özelliklerle ilişkisinin saptanması*. Uzmanlık Tezi, Atatürk Üniversitesi, Erzurum.
164. Uzun, D. (2008). *Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri dokularında HER-2/NEU ve EGFR genlerinin real time PCR yöntemiyle incelenmesi*. Yüksek Lisans Tezi, Osmangazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
165. Goswami, S., Wang, W., Wyckoff, J.B. and Condeelis, J.S. (2004). Breast cancer cells isolated by chemotaxis from primary tumors show increased survival and resistance to chemotherapy. *Cancer Research*. 64, 7664–7667.
166. Schmittgen, T.D. and Livak, K.J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat. Protoc.* (3), 1101–1108.
167. Lodish, H., Berk, A., Zipursky, L.S., Matsudaira, P., Baltimore, D. and Darnell, J. (2000). In: *Cellular Energetics: Glycolysis, Aerobic Oxidation, and Photosynthesis*. *Molecular Cell Biology*.
168. May-Panloup, P., Chretien, M.F., Malthiery, Y. and Reynier, P. (2007). Mitochondrial DNA in the oocyte and the developing embryo. *Current Topics in Developmental Biology*, (77), 51–83.
169. Liu, L., Trimarchi, J.R. and Keefe, D.L. (2000) .Involvement of mitochondria in oxidative stress-induced cell death in mouse zygotes. *Biology Reproduction*, (6), 1745–1753.
170. Johnson, M.H. and Nasr-Esfahani, M.H. (1994). Radical solutions and cultural problems: could free oxygen radicals be responsible for the impaired development of preimplantation mammalian embryos in vitro? *Bioessays*, (16), 31–38.
171. Sirard, M.A., Richard, F., Blondin, P. and Robert, C. (2006). Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenol*, (65), 126–136.
172. Katayama, M., Zhong, Z.S., Lai, L., Sutovsky, P., Prather, R.S. and Schatten H. (2006). Mitochondria distribution and microtubule organization in fertilized and cloned porcine embryos: Implications for developmental potential. *Developmental Biology*, (299), 206–220.

173. Calarco, P.G. (1995). Polarization of mitochondria in the unfertilized mouse oocytes. *Developmental Genetics*, (16), 36–46.
174. Gauden, M.E. (1992). Maternal age effect: the enigma of Down syndrome and other trisomic conditions. *Mutation Research*, (296), 69–88.
175. Chandra, D. and Singh, K.K. (2011). *Biochimica et Biophysica Acta*, 1807(6), 620-5.
176. Bendich, A.J. (2007). The size and form of chromosomes are constant in the nucleus, but highly variable in bacteria, mitochondria and chloroplasts. *BioEssays*, 29(5), 474–483.
177. Chinnery, P. and Hudson, G. (2013). Mitochondrial genetics. *The British Medical Bulletin*, 106(1), 135–159.
178. Chandra, D. And Singh, K.K. (2011). *Biochimica et Biophysica Acta*, 1807(6), 620-5.
179. Ricardo, G. (2011). DNA Damage and Base Excision Repair in Mitochondria and Their Role in Aging. *Journal of Aging Research*.
180. Hamatani, T., Falco, G., Carter, M.G., Akutsu, H., Stagg, C., Sharov, A., Dudekula, B., VanBuren, V. and Ko, M. (2004). Age-associated alteration of gene expression patterns in mouse oocytes. *Human Molecular Genetics*, 2263–2278.
181. Stuart, J.A., Maynard, S., Hashiguchi, K., Souza-Pinto, N.C. and Bohr, V.A. (2005). Localization of mitochondrial DNA base excision repair to an inner membrane-associated particulate fraction. *Nucleic Acids Research*, (33), 3722–3732.
182. Canugovi, C., Maynard, S., Baynel, A., Sykora, P., Tian, J., Nadja, C., Deborah, L. and Bohr, V. (2010). The mitochondrial transcription factor A functions in base excision repair. *DNA Repair*, 9(10), 1080–1089.
183. Gredilla, R., Garma, C., Holma, R., Bohr, V.A. and Stevnsner, T. (2010). Differential age related changes in mitochondrial DNA repair activities in mouse brain regions, 31(6), 993–1002.
184. Boesch, P., Weber-Loffi, F., Ibrahim, N., Tarasenko, V., Cosset, A. and Paulus, F. (2011). Lightowers, A. Dietrich, DNA repair in organelles: pathways, organization, regulation, relevance in disease and aging. *Biochim. Biophys. Acta*, 1813,186, 200.
185. Kazak, L., Reyes, A. and Holt, J.J. (2012). Minimizing the damage: repair pathways keep mitochondrial DNA intact, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*, (13), 659-671.
186. Haince, J.F., McDonald, D., Rodrigue, A., Dery, U., Masson, J.Y., Hendzel, M.J. and Poirier, G.G. (2008). PARP1-dependent kinetics of recruitment of

- MRE11 and NBS1 proteins to multiple DNA damage sites. *J. Biol. Chem.*, (283), 1197–1208.
187. de Murcia, J.M., Niedergang, C., Trucco, C., Ricoul, M., Dutrillaux, B., Mark, M., Oliver, F.J., Masson, M., Dierich, A., LeMeur, M. *et al.* (1997). Requirement of poly(ADP-ribose) polymerase in recovery from DNA damage in mice and in cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences. U.S.A.*, (94), 7303–7307.
 188. Trucco, C., Oliver, F.J., de Murcia, G. and Menissier-de-Murcia, J. (1998). DNA repair defect in poly(ADP-ribose) polymerase-deficient cell lines. *Nucleic Acids Reserach.*, (26), 2644–2649.
 189. Shar-yin, N., Huang , Junko, M., Ilaria, D. , Thomas, S. , Alena, N. , William ,H. and Yves, P. (2013). TDP1 repairs nuclear and mitochondrial DNA damage induced by chain-terminating anticancer and antiviral nucleoside analogs2013 *Nucleic Acids Research*,41(16), 7793–7803.
 190. Das, B.B., Dexheimer, T.S., Maddali, K. and Pommier, Y. (2010). Role of tyrosyl-DNA phosphodiesterase (TDP1) in mitochondria, 107(46), *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 19790–19795.
 191. Hok Khim,F., Miraj, K., Cheryl, W., Kunho, C., Cornelius, F., and Glenda ,H. (2013). Expression profile and mitochondrial colocalization of Tdp1 in peripheral human tissues *Journal of Molecular Histology* ,(44), 481–494.
 192. Marianna, N., Rossi,M., Cassandra, M., Carmine, M., Marco, T., Rossella, M., and Paolo, A. (2009). Mitochondrial Localization of PARP-1 Requires Interaction with Mitofilin and Is Involved in the Maintenance of Mitochondrial DNA Integrity, *The Journal Of Biological Chemistry*, 284(46), 31616–31624.





EKLER

EK-1. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Kararı



NEW YORK MEDICAL COLLEGE

DEPARTMENT OF COMPARATIVE MEDICINE
 40 SUNSHINE COTTAGE ROAD, BASIC SCIENCES BUILDING
 VALHALLA, NEW YORK 10595 TEL 914-594-4215 FAX 914-594-4223

March 6, 2015

IACUC REVIEW FORM
IACUC APPROVAL #: 9-2-0115H
DATE OF IACUC REVIEW: 2/19/15

Investigator: Kutluk Oktay*Department:* OB/GYN

Title of proposal: Characterization & Prevention of Chemotherapy-
 induced Damage due to Ovarian Reserve

Status: 3rd year renewal*Granting Agency:* NIH

IACUC Review:

XXXXXX IACUC Approval was granted as presented. The
 IACUC approval number is provided above. This number
 must be presented to order animals for your study.

_____ IACUC Approval was not granted. Please resubmit the
 protocol with the following modifications to secure approval:

Signature: _____ *K. Elson*

EK-2. Denev Hayvanları Uygulama ve Etik Kursu Katılım Sertifikası



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : KARTAL Bahar
 Uyuğu : T.C
 Doğum tarihi ve yeri : 1981 ADANA
 Medeni hali : Evli
 Telefon : 0532 153 98 87
 e-mail : bahar.kartal@outlook.com



Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Doktora	G.Ü Tıp Fak. Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı	2015-Devam ediyor
Yüksek Lisans	G.Ü Tıp Fak. Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı	2011
Lisans	A.Ü Fen Fak. Biyoloji Bölümü	2008
Lise	Adana Ticaret Odası Anadolu Lisesi	1999

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2013	Gazi Üniversitesi	Araştırma Görevlisi

Yabancı Dil

İngilizce



GAZİ GELECEKTİR...